

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

Caracterización histológica del timo en fetos de alpaca

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Juan Ignacio Montenegro Bernal

ASESORA

Nieves Sandoval Chaupe

Lima – Perú

2006

DEDICATORIAS

A la memoria de Sultán, leal amigo y protector

A mis padres Fernán Nieves y Virginia Paula,
mis hermanos Maribel, Edson y Magaly.

A San Marcos, mi alma mater.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nieves Sandoval, mi gratitud eterna por su amistad, confianza y paciencia; sin menoscabar el apoyo, dirección y orientación en la ejecución del presente trabajo.

A los Doctores Víctor Parraguez, César Montalvo, Walter Bravo, Alfonso Chavera, Alberto Manchego, Rosa Davalos, Ofelia Pagan, Olga Li y Luis Hoyos; por sus sabios consejos y datos científicos que aportaron y enriquecieron el presente trabajo.

A Cecilia Sosa, Walter Arias, Ivan Gordillo, Christian Fajardo, Gino Vergara, Raúl Flores, Alexis Salas, Elmer Badajoz, David García y la Sra. Normita Aquino; por su amistad, aliento y apoyo durante la ejecución del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. El timo.....	10
2.2. Localización.....	10
2.3. Origen.....	10
2.4. Organización del timo.....	12
2.5. Estructura histológica.....	13
2.5.1. Cápsula.....	13
2.5.2. Trabéculas.....	13
2.5.3. Corteza.....	13
2.5.4. Médula.....	14
2.6. Características celulares del timo.....	15
2.6.1. Células reticulares epiteliales.....	15
2.6.2. Timocitos.....	15
2.7. Vascularización.....	17
2.7.1. Barrera timo-sangre.....	18
2.8. Inervación.....	18
2.9. Evolución é involución.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Materiales.....	20
3.1.1. Especímenes.....	20
3.1.2. Material de recolección, clasificación y disección de muestras.....	20
3.1.3. Material de fijación y procesamiento histológico.....	20
3.1.4. Materiales de coloración.....	20
3.1.5. Material de microfotografía.....	21
3.1.6. Otros.....	21
3.2. Métodos.....	21

3.2.1. Procesamiento de especímenes.....	21
3.2.2. Determinación de la edad fetal.....	21
3.2.3. Obtención de la muestras del timo.....	21
3.2.4. Muestra tomada.....	21
3.2.5. Procesamiento histológico.....	21
3.2.6. Lectura histológica.....	24
3.2.7. Fotografiado de láminas histológicas.....	24
IV. RESULTADOS.....	25
4.1. Descripción histológica.....	27
4.1.1. Edad fetal 40 días.....	27
4.1.2. Edad fetal 60 días.....	29
4.1.3. Edad fetal 100 días.....	32
4.1.4. Edad fetal 130 días.....	37
4.1.5. Edad fetal 165 días.....	40
4.1.6. Edad fetal 190 días.....	44
4.2. Medida diametral de los timocitos.....	48
4.3. Resumen del desarrollo citoarquitectural.....	48
V. DISCUSIÓN.....	50
VI. CONCLUSIONES.....	56
VII. RECOMENDACIONES.....	57
VIII. LITERATURA CITADA.....	58
IX. ANEXOS.....	62
9.1. Fijador de formalina bufferada neutral.....	62
9.2. Fijador de Bouin.....	62
9.3. Tinción de Hematoxilina eosina.....	62
9.4. Tinción de Masson.....	63
9.5. Tinción de Wilder.....	63
9.6. Tinción de Johnson.....	64

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Edad fetal de los especímenes.
- Figura 2. Determinación de la edad fetal.
- Figura 3. Obtención de secciones transversales del área cervical y mediastino anterior.
- Figura 4. Exposición del timo cervical.
- Figura 5. Exposición del ingreso del timo cervical a cavidad torácica y timo torácico.
- Figura 6. Exposición de la unión del timo cervical derecho e izquierdo por el istmo.
- Figura 7. Morfología “*in situ*” del timo torácico.
- Figura 8. Estructura “acinar” del esbozo tímico de 40 días.
- Figura 9. Vista panorámica de los esbozos tímicos de 40 días.
- Figura 10. Aparición de algunas células linfocíticas en el esbozo tímico de 40 días.
- Figura 11. Estructura “folicular” del esbozo tímico cervical de 60 días.
- Figura 12. Estructura “cavitaria” del esbozo tímico torácico de 60 días.
- Figura 13. Población celular en el esbozo tímico torácico de 60 días.
- Figura 14. Bicapa capsular del esbozo tímico cervical de 100 días.
- Figura 15. Células eritroblásticas en el esbozo tímico cervical de 100 días.
- Figura 16. Conformaciónseudolobulillar del esbozo tímico torácico de 100 días.
- Figura 17. Células eritroblásticas en áreas trabeculares del esbozo tímico torácico de 100 días.
- Figura 18. Células reticulares epiteliales limitantes del esbozo tímico torácico de 100 días.
- Figura 19. Macrófagos en el esbozo tímico torácico de 100 días.
- Figura 20. Corpúsculo de Hassal en el esbozo tímico torácico de 100 días.
- Figura 21. Fibras colágenas en área trabecular del esbozo tímico torácico de 130 días.
- Figura 22. Mastocito en área trabecular del esbozo tímico torácico de 130 días.
- Figura 23. Trama citoreticular del esbozo tímico de 130 días.
- Figura 24. Barrera citoreticular en área corticomedular del esbozo tímico de 130 días.

- Figura 25. Conformación lobulillar del esbozo tímico cervical de 165 días.
- Figura 26. Vasos corticomedulares del esbozo tímico cervical de 165 días.
- Figura 27. Población celular en área trabecular del esbozo tímico torácico de 165 días.
- Figura 28. Mastocito en área trabecular del esbozo tímico torácico de 165 días.
- Figura 29. Población celular en área trabecular del esbozo tímico cervical de 190 días.
- Figura 30. Células eritroblásticas en área subcapsular del esbozo tímico cervical de 190 días.
- Figura 31. Vaso sanguíneo cortical en el esbozo tímico cervical de 190 días
- Figura 32. Fibras reticulares en área trabecular del esbozo tímico torácico de 190 días.

LISTA DE TABLAS:

- Tabla 1. Edades fetales.
- Tabla 2. Medida diametral de los timocitos.
- Tabla 3. Resumen del desarrollo citoarquitectural.

LISTA DE ESQUEMAS:

- Esquema 1. Estructura anatómica e histológica del timo de alpaca.
- Esquema 2. Estructura histológica del timo cortical.
- Esquema 3. Estructura histológica del timo medular.
- Esquema 4. Estadios de la maduración del timocito.
- Esquema 5. Estructura histológica vascular tímica.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el estudio citoarquitectural de los segmentos cervicales y torácicos del timo en fetos de alpaca (*Lama pacos*), que ofrece complementos al conocimiento de este órgano. Para tal propósito, se recolectaron 10 fetos entre 41 y 188 días de edad, y ellos fueron diseccionados y sometidos a estudio histológico. Los resultados más importantes muestran que el esbozo del timo a los 40 días tiene una morfología citoarquitectural de tipo acinar infiltrado por escasas células linfocíticas y rodeado por células mesenquimales. A los 60 días el esbozo del segmento cervical se presenta como un “folículo” linfoide densamente poblado por timocitos; mientras que la región torácica tiene una apariencia cavitaria con proyecciones trabeculares cortas hacia la zona interna del esbozo. La diferenciación de corteza y médula primero se evidencian en los segmentos cervicales posteriores y torácicos a los 100 días, donde el parénquima tímico comienza a tener proyecciones trabeculares más definidas, dándole la apariencia de seudolobulaciones y es a los 130 días donde se evidencia una tenue diferenciación entre corteza y médula en los segmentos cervicales anteriores. A los 165 días todos los segmentos cervicales, así como el torácico, presentan disposición lobulillar bien definidos en corteza y médula. La cápsula tímica se mantiene principalmente como una doble capa celular y tejido conjuntivo laxo. Los vasos sanguíneos subcapsulares y trabeculares presentan endotelio fenestrado. Las células eritroblásticas se ubican en las zonas subcapsulares y corticales periféricas desde los 100 días. La barrera hematotímica comienza a organizarse desde los 60 días. Los corpúsculos medulares de Hassal son evidentes a los 100 días, así como la barrera celular reticular epitelial en la zona corticomedular desde los 130 días.

Palabras clave: Alpaca, feto, timo, timocito, corpúsculo de Hassal.

SUMMARY

The aim of the present research was to study the cellular architectural features of the thymus' cervical and thoracic segments in alpaca fetuses (*Lama pacos*), and provide accurate information to the knowledge of this organ. For such purpose, 10 alpaca fetuses aged 41-188 days were collected, dissected and histologically analyzed. The most important results shown that the thymus' anlage, at 40 days of age, had an acinar architectural morphology infiltrated by a few lymphoid cells and surrounded by mesenchymal cells. At 60 days of age, the anlage of cervical region appeared as a lymphoid "follicle" with a dense population of thymocytes, whereas the thoracic region had a cystic appearance with short trabecular projections toward the anlage's inner zone. At 100 days of fetal age, first differentiation between cortex and medulla was evident in the posterior cervical and thoracic segments, where the thymic parenchyma started to have well-defined trabecular projections, giving it an appearance of pseudolobulations. Also, at 130 days of age a little differentiation between the cortex and medulla in the anterior cervical segments was observed. At 165 days of fetal age, all the cervical and thoracical segments shown a well-defined lobular arrangement in the cortex and medulla. Thymic cap remained mainly as a double cellular layer of lax connective tissue. Subcapsular and trabecular blood vessels shown fenestrated endothelium. Erythroblastic cells in the peripheral subcapsular and cortical zones since 100 days were observed. Hema-thymic barrier started to be arranged since 60 days. Hassal's medullar corpuscle at 100 days, as well as the epithelial reticular cellular barrier in the cortical-medullar zone since 130 days were seen.

Key words: Alpaca, fetus, thymus, thymocyte, Hassal's corpuscle.

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Lama pacos*), pertenece a la familia *Camelidae* de los camélidos sudamericanos, especie oriunda de Sudamérica que se desarrolla en valles interandinos. En esta región los recursos naturales son escasos, por lo que esta especie es una importante fuente de recurso económico; no sólo en la producción de fibra, valiosa para la industria textil, sino también por su carne, importante fuente de proteínas, además de la producción de cueros y pieles de los que se derivan ciertas actividades artesanales, y de las deyecciones que son empleados ya sea como abono o combustible. (Espinoza-Chueca, 1995).

El bajo nivel tecnológico en la crianza de camélidos y su susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas, tales como: enterotoxemia, complejo diarreico neonatal, fiebre de alpaca o enfermedad de Preston, neumonía aguda o neumonía enzoótica, muerte súbita o braxy, necrobacilosis (Bustinza, 2000); ocasiona una elevada tasa de morbilidad y mortalidad, siendo estos factores las principales limitantes de la producción alpaquera de las regiones alto andinas.

En los mamíferos, la respuesta frente a un agente patógeno es dado por el sistema inmune, que está compuesto por órganos primarios como el timo, donde se forman y maduran las células linfoides, y los órganos secundarios donde se almacenan y reactivan las células linfoides.

La estructura histológica del timo ha sido estudiada en la mayoría de especies rumiantes domésticas y dichos estudios concluyen en la existencia de una similitud básica entre especies, así como también, está establecida la ontogenia de su sistema inmune. Sin embargo, no se encuentran reportes de estudios realizados en fetos de camélidos sudamericanos.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es la caracterización histológica citoarquitectural del timo en la etapa fetal y comprender mejor la importancia de dicho órgano, estableciendo los tipos celulares que lo conforman durante su desarrollo estructural e infiriendo la probable función inmunológica que pueda efectuar en la etapa fetal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL TIMO.

Es un órgano linfático que cumple un rol central en el sistema inmune y su mayor función es la de proveer el microambiente apropiado dentro del cual las células inmaduras indiferenciadas procedentes de órganos hematopoyéticos puedan desarrollar, proliferar, madurar, generar su repertorio de receptores de antígenos; produciendo células linfoides de la línea T y luego ellas abandonan el órgano para entrar al grupo de linfocitos recirculantes los cuales ayudan a proteger al animal contra los patógenos (Romano *et al.*, 1999a). Sin embargo, el timo no es un sitio de respuesta inmune humoral o celular (Henrikson *et al.*, 1997).

2.2. LOCALIZACIÓN.

En las especies ruminantes domésticas adultas, incluyendo los camélidos sudamericanos, la porción torácica del timo se localiza en el lado izquierdo del mediastino anterior, posterior al esternón y anterior al arco aórtico, arteria pulmonar y corazón, y dorsalmente se extiende hasta el lóbulo apical del pulmón izquierdo (Henrikson *et al.*, 1997; Tizard, 2002; Sisson *et al.*, 2000). En caballos, bovinos, ovinos, cerdos y pollos también se extiende hacia arriba por la región del cuello, hasta el tiroides (Tizard, 2002). Con respecto a la ubicación en los fetos de ruminantes domésticos, el estudio del timo fetal de búfalo de agua reveló que exhibe 2 lóbulos: un lóbulo torácico desarrollado completamente y un lóbulo cervical que demuestra 3 porciones definidas, una porción mediana caudal y dos porciones laterales craneales, el último está unido a la primera por un istmo (Machado *et al.*, 2001). En los animales jóvenes la porción torácica del timo presenta dos lóbulos (Sisson *et al.*, 2000).

2.3. ORIGEN.

En los mamíferos, el timo deriva de las evaginaciones provenientes de las porciones más ventrales de la tercera y cuarta bolsas faríngeas (Carlson, 1990). El timo está presente en todos los vertebrados excepto posiblemente en los ciclóstomos y se deriva del epitelio de uno (por lo general) o de varias bolsas faríngeas; la faringe se forma a partir de la porción del intestino anterior que se localiza entre la cavidad bucal en desarrollo y el esófago (Hildebrand, 1991). La faringe está rodeada lateral y

ventralmente por mesenquima derivado de las crestas neurales, constituyendo embriológicamente a las bolsas faríngeas, las cuales son una serie de 4 ó 5 pares de evaginaciones laterales del endodermo faríngeo. La parte distal (lateral) de cada bolsa faríngea crece dorsal y ventralmente y éstas se unen íntimamente al ectodermo tapizando el fondo de los surcos viscerales donde sólo las tres primeras bolsas contactan con el ectodermo (Noden *et al.*, 1990). El primordio del timo debe expandirse desde el endodermo faríngeo con la adhesión de contribuciones desde el ectodermo (Bockman, 1998). El timo se desarrolla de la tercera bolsa endodermal (faríngea) y la tercera hendidura ectodermal (surco visceral), y se compone de una región endodermal central y de una región ectodermal periférica (Cordier *et al.*, 2005). El endodermo ventral de ésta bolsa da origen a las células reticulares epiteliales del timo (Noden *et al.*, 1990).

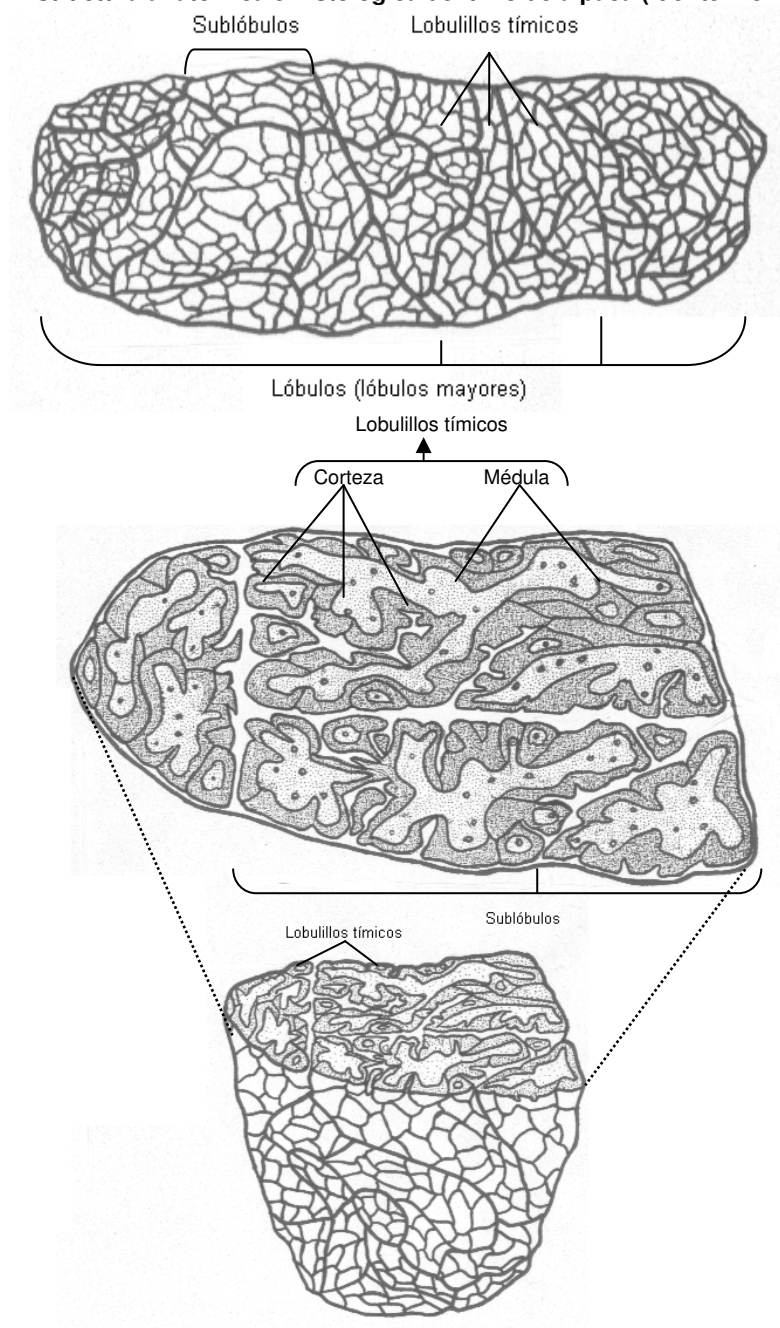
Al proseguir el desarrollo del esbozo del timo, las bolsas faríngeas cierran su abertura y se separan de la cavidad faríngea y comienza a migrar en dirección caudal hasta alcanzar su localización definitiva en el tórax, fusionándose de manera superficial con su par correspondiente del otro lado (derecho e izquierdo). Parte del mismo permanece en la región cervical, estos cordones epiteliales que se forman crecen en dirección caudal y se engrosan en su extremo distal, de tal manera que el esbozo del timo presenta una porción cervical delgada y una torácica gruesa y tuberosa (Noden *et al.*, 1990).

La penetración de vasos sanguíneos a partir del tejido conjuntivo que lo rodea, inicia la transformación de la estructura epitelial sólida en un retículo epitelial tridimensional (Dellmann *et al.*, 1980), invadidos por linfoblastos (Dellmann *et al.*, 1980; Smith, 2005b) originados a partir de células mesenquimatosas (Junqueira *et al.*, 1988) que derivan a la línea celular linfopoyética del mesodermo de la vesícula vitelina, más tarde del hígado y postnatalmente de la médula ósea (Junqueira *et al.*, 1988; Noden *et al.*, 1990; Le Douarin *et al.*, 2005). Es importante mencionar que aún antes que sea invadido por las células linfáticas, las fibras nerviosas autónomas penetran el primordio del timo (Carlson, 1990). A medida que el timo evoluciona, las células endodérmicas originales se transforman en tejido reticular especializado que alberga a los timocitos (Carlson, 1990) y finalmente, éste tejido linfoepitelial termina por organizarse en dos zonas bien diferenciadas: corteza y médula (Dellmann *et al.*, 1980).

2.4. ORGANIZACIÓN DEL TIMO.

El timo está cubierto por una cápsula, que ingresa al parénquima formando trabéculas y dividiéndolo en lobulillos (Banks, 1992), que representan las unidades básicas del órgano, los cuales conforman los sublóbulos medianos, los que a su vez formarán los lóbulos mayores. Los lobulillos tímicos de la alpaca adulta no son unidades completamente separadas sino que se interconectan debido a que las médulas de dichos lobulillos son confluyentes (Fernández, 1999), debido a la naturaleza discontinua de las trabéculas que delimitan sólo porciones corticales de los lobulillos (Junqueira *et al.*, 1988; Banks, 1992; Fernández, 1999). (*Esquema 1*).

Esquema 1: Estructura anatómica e histológica del timo de alpaca (fuente: Fernández, D. 1999)



2.5. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA.

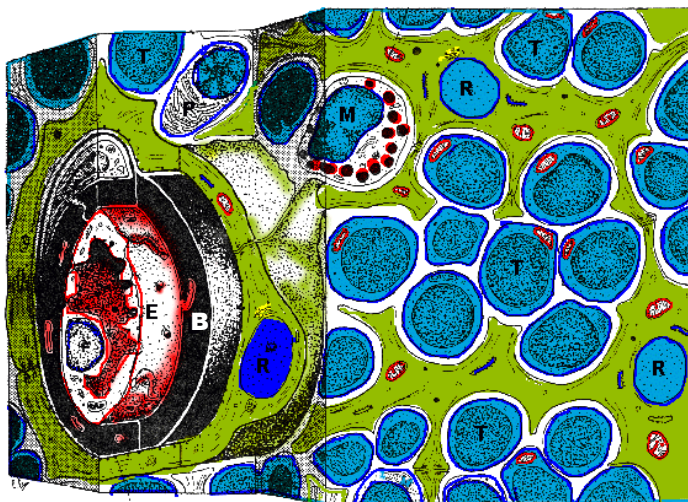
2.5.1. Cápsula.- Rodea todo el órgano y está conformada por tejido colágeno laxo (Banks, 1992), la cual se extiende hasta los sublóbulos. Ésta cápsula es muy delgada y se encuentra adherida al parénquima (Fernández, 1999), se compone de 2 capas: una externa que cubre la periferia del lóbulo y una interna que delimita completamente el contorno periférico de la corteza del lóbulo (Sainte-Marie *et al.*, 2005). Por fuera del timo de la alpaca adulta se observa tejido adiposo (Espinoza-Chueca, 1995).

2.5.2. Trabéculas.- Son extensiones de la cápsula de cada sublóbulos que se emiten en forma discontinua conformados por fibras colágenas y pocas fibras reticulares; éstas trabéculas sólo delimitan las porciones corticales del lobulillo tímico mas no de la médula y algunas contienen vasos sanguíneos (Fernández, 1999) y también tejido adiposo (Espinoza-Chueca, 1995).

2.5.3. Corteza.- Predominan los timocitos, principalmente los pequeños (Junqueira *et al.*, 1988), y en la zona subcapsular una mezcla de pro-timocitos (linfoblastos) y pequeños timocitos (Henrikson *et al.*, 1997). Las células reticulares epiteliales están en “menor proporción”, son estrelladas y relativamente grandes con citoplasma y núcleos pálidos, grandes, esféricos u ovoides (Dellmann *et al.*, 1980). Éstas células son parcialmente enmascarados por los numerosos timocitos (Henrikson *et al.*, 1997) que proliferan rápidamente en la corteza y están dispuestos densamente lo cual hace difícil la observación de las células reticulares epiteliales en preparaciones de microscopia óptica, también se observan algunos macrófagos y células plasmáticas (Dellmann *et al.*, 1980; Varas *et al.*, 2003) y células lipopigmentadas (Smith, 2005a). (Esquema 2).

Esquema 2: Estructura histológica del timo cortical (fuente: Carrascal, E. 2005. eliseo@gugu.usal.es.)

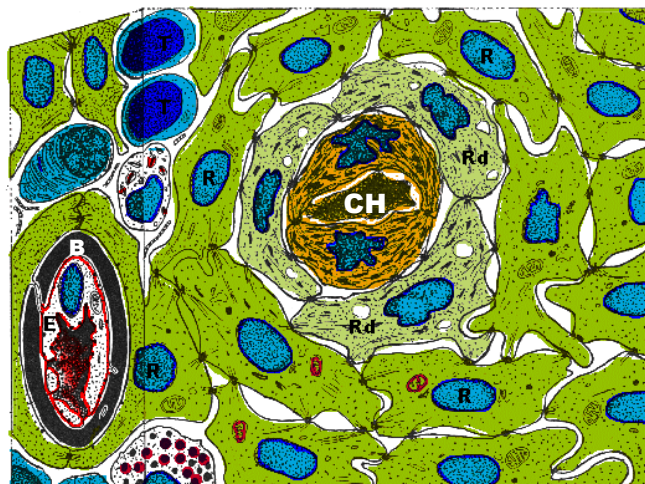
Las células reticulares epiteliales (R) forman el citoretículo en cuyos intersticios se encuentran: vasos sanguíneos con endotelio plano (E) sobre una gruesa lámina basal (B), timocitos (T), algún mastocito (M) y plasmocito (P).



2.5.4. Médula.- Tiene esencialmente la misma estructura que la corteza, además de una red de células reticulares epiteliales entremezcladas con timocitos (Dellmann *et al.*, 1980), los cuales están en menor densidad que en la corteza, dando como resultado la pálida apariencia de la médula en cortes histológicos (Henrikson *et al.*, 1997), lo que permite que las células reticulares epiteliales medulares se identifiquen más fácilmente al análisis histológico (Dellmann *et al.*, 1980). La característica definitiva para su identificación es la presencia de corpúsculos tímicos o de Hassal en la médula (Banks, 1992). El corpúsculo tímico tiene forma parecida a un quiste con células reticulares epiteliales dispuestas concéntricamente (Henrikson *et al.*, 1997), las células escamosas centralmente localizadas carecen de núcleo y se asemeja a células epidermales queratinizadas (Henrikson *et al.*, 1997); a veces se observan en el centro del corpúsculo vestigios de un pequeño vaso sanguíneo (Tizard, 2002). En el comienzo de su desarrollo, una célula reticular epitelial aislada se redondea, aumenta de tamaño y llega a queratinizarse o a hialinizarse. Posteriormente, las células reticulares epiteliales de los alrededores se aplanan y forman capas concéntricas alrededor de dicha zona central (Dellmann *et al.*, 1980). El corpúsculo o parte de éste puede sufrir cornificación e incluso calcificación (Banks, 1992). Los corpúsculos de Hassal más grandes pueden albergar otros tipos celulares como macrófagos (Henrikson *et al.*, 1997). En la médula de algunas especies de teleósteos como de reptiles, se ha observado otro tipo celular denominado célula mioide porque su estructura se compara a las configuraciones similares de la fibra muscular (Romano *et al.*, 1999a; Bockman *et al.*, 2005). (Esquema 3).

Esquema 3: Estructura histológica del timo medular (fuente: Carrascal, E. 2005. eliseo@gugu.usal.es.)

Las células reticulares epiteliales (R) dispuestas concéntricamente sobre R en degeneración (Rd) queratinizadas y necrosadas, conforman el corpúsculo de Hassal (CH). Timocitos (T), los vasos sanguíneos poseen un endotelio (E) grueso fenestrado sobre una gruesa lámina basal (B) son envueltos por prolongaciones de R conformando la barrera hematotímica.



2.6. CARACTERÍSTICAS CELULARES DEL TIMO.

Las células más abundantes en el timo son los timocitos en diversos estadios de maduración y las células reticulares epiteliales. Además, el timo posee células reticulares mesenquimatosas (dendríticas) y macrófagos (Junqueira *et al.*, 1988).

2.6.1. Células reticulares epiteliales.- Las células reticulares epiteliales primitivas se diferencian gradualmente en varios subtipos celulares de corteza y médula (Vicente *et al.*, 1998), y éstas tienen un origen mixto, ectodermal y endodermal (Cordier *et al.*, 2005). Las células reticulares epiteliales se clasifican en base a su localización y características citológicas como (Romano *et al.*, 1999b; Romano *et al.*, 1999a):

- ❶ Células reticulares epiteliales limitantes, localizadas en la zona subcapsular, perivascular y peritrabecular.
- ❷ Células reticulares epiteliales corticales y medulares, localizadas como su nombre indica.
- ❸ Células reticulares epiteliales nodrizas o de transición, localizadas en el borde entre la corteza y la médula.
- ❹ Corpúsculos de Hassal, localizados en la médula.

Las células reticulares epiteliales tienen núcleos grandes, cromatina fina, gránulos densos que podrían significar una secreción (Junqueira *et al.*, 1988). Estas células forman el armazón tridimensional celular (Henrikson *et al.*, 1997), no se asocian a fibras reticulares, de modo que el retículo existente en el timo, en cuyas mallas los timocitos proliferan, está conformado sólo por prolongaciones citoplasmáticas que se unen a otras células adyacentes mediante desmosomas (Junqueira *et al.*, 1988; Banks, 1992). Además de tonofibrillas, también presentan filamentos intermedios de queratina (Henrikson *et al.*, 1997), lo que recuerda su origen epitelial (Junqueira *et al.*, 1988).

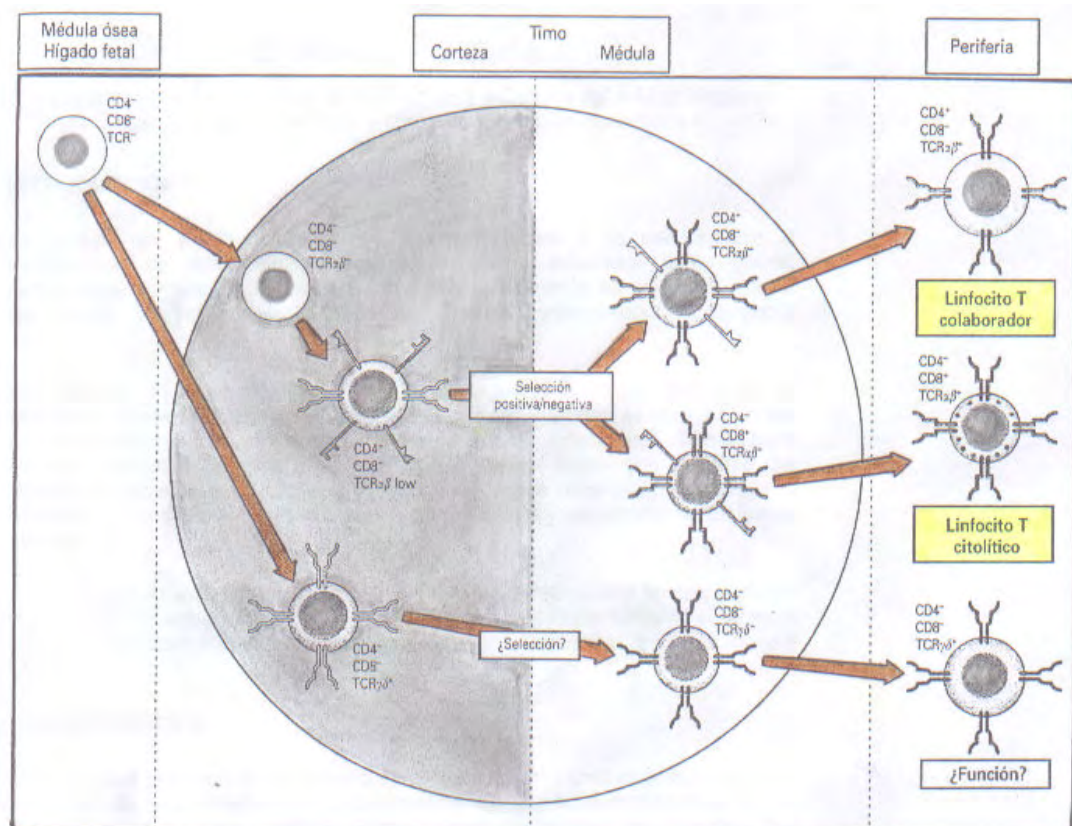
2.6.2. Timocitos.- Los timocitos están dispuestos dentro de los intersticios del retículo celular (Henrikson *et al.*, 1997), éstas células se diferencian de linfoblastos que son reclutados por el timo desde los órganos hematopoyéticos; ya en el parénquima tímico se encuentran en diferentes estadios de maduración (Junqueira *et al.*, 1988), se dividen con rapidez y de las nuevas células producidas la mayor parte mueren pronto, de éste modo la apoptosis dentro de la corteza y médula tímica ocasiona la destrucción selectiva de aquellos timocitos que reconocen antígenos propios y

podrían causar reacciones de autoinmunidad y así puedan migrar y almacenarse en órganos linfoides secundarios como linfocitos T capacitados (Tizard, 2002).

Las subpoblaciones de timocitos no están distribuidos aleatoriamente a través del parénquima tímico; más bien están localizados en dominios discretos (Van Ewijk, 2005). La localización intratímica de las diversas fases madurativas comprenden: los timocitos doble negativos $CD4^-CD8^-$, se localizan en la zona subcapsular de la corteza; los pequeños timocitos doble positivos $CD4^+CD8^+$, se localizan en el parénquima cortical; los timocitos maduros de una sola positividad $CD4^+CD8^-$ ó $CD4^-CD8^+$, se ubican en el parénquima medular (Iañez, 1999). Aunque las subpoblaciones distintas de timocitos han sido caracterizados, se ha establecido corrientes de desarrollo separados más bien que etapas secuenciales de la diferenciación, siendo éstas $CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta$, $CD4^-CD8^+TCR\alpha\beta$, $CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta$ (Shortman, 2005). (Esquema 4). Las diferencias en la morfología del timocito y su tamaño fueron evidentes entre las regiones tímicas, los timocitos medulares mostraron núcleo más grande y más citoplasma (Romano *et al.*, 1999a).

Esquema 4: Estadios de maduración del timocito (fuente: Abbas, A. *et al.* 2002)

Se ilustran los acontecimientos que corresponden a cada estadio de la maduración del timocito, desde la célula madre de la médula ósea hasta el linfocito T maduro. Se utilizaron diversos marcadores de superficie además de los mostrados en el esquema para definir los estadios específicos de la maduración de los timocitos. Receptor de la célula T (TCR), complejo de diferenciación (CD).

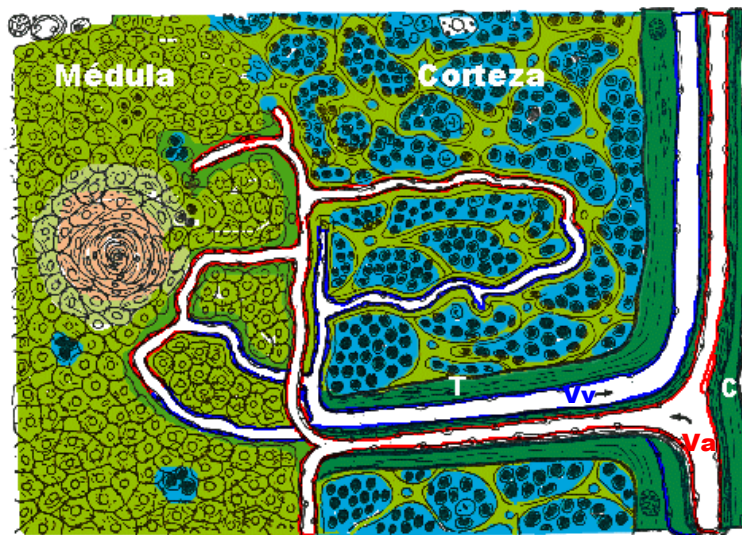


2.7. VASCULARIZACIÓN.

Las arterias que penetran en el timo por la cápsula, y sus ramas más finas alcanzan la zona medular (Junqueira *et al.*, 1988). Las arterias tímicas se ramifican dentro del tejido conjuntivo interlobular (trabéculas) y entran al órgano en la unión corticomedular de los lóbulos. A su vez, los capilares arteriales penetran y atraviesan la corteza en la periferia del parénquima cortical (Banks, 1992). Los vasos sanguíneos corticales ingresan a la cápsula y trabéculas en los cuales forman una red capilar. Estos capilares capsulares son fenestrados y los leucocitos estuvieron a menudo cercanos a estos vasos sanguíneos (Sainte-Marie *et al.*, 2005). Las ramificaciones arteriolas provenientes de los vasos sanguíneos corticomedulares entran a la médula, se ramifican en capilares y regresan como venas medulares hacia la unión corticomedular. Aunque algunos vasos sanguíneos confluyen con vénulas tímicas en la cápsula, la mayoría cambia su dirección, con lo que forma arcadas dentro de la corteza y drena hacia las vénulas de la unión corticomedular y de la médula (Banks, 1992). A través de las trabéculas las venas medulares de la unión corticomedular pasan a la cápsula y por ella salen del órgano (Junqueira *et al.*, 1988). La penetración inusual de capilares del parénquima tímico que ingresan a la cápsula, sugirió que los capilares capsulares participen en acontecimientos tímicos peculiares, tales como el reclutamiento de células precursoras sanguíneas (Sainte-Marie *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 1998). El timo no posee vasos linfáticos aferentes (Junqueira *et al.*, 1988; Dellmann *et al.*, 1980; Banks, 1992). Los pocos vasos linfáticos que se encuentran en el timo son todos eferentes y se localizan en las paredes de los vasos sanguíneos de mayor calibre, en las trabéculas y en la cápsula (Junqueira *et al.*, 1988). (Esquema 5).

Esquema 5: Estructura histológica vascular tímica (fuente: Carrascal, E. 2005. eliseo@gugu.usal.es.)

Desde el espesor de la cápsula tímica (C) discurren las arterias capsulares de las que emergen otras que se localizan en el seno trabecular (T) hasta el límite corticomedular. Vaso sanguíneo arterial (Va), vaso sanguíneo venoso (Vv).



2.7.1. Barrera timo-sangre.- La barrera protege a los timocitos de los antígenos. Una membrana basal en extremo gruesa y una capa continua de células reticulares epiteliales rodean a los capilares que irrigan la corteza (Tizard, 2002; Junqueira *et al.*, 1988). Las células endoteliales poseen prolongaciones finas que perforan la membrana basal y pueden entrar en contacto con las células reticulares epiteliales (Junqueira *et al.*, 1988), se pueden encontrar macrófagos perivascuales que fagocitan las pequeñas cantidades de material que cruzan las paredes de los vasos sanguíneos (Henrikson *et al.*, 1997). Por otro lado, los vasos sanguíneos de la unión corticomedular y de la médula son suficientemente permeables a macromoléculas y timocitos (Henrikson *et al.*, 1997; Banks, 1992).

2.8. INERVACIÓN.

Una red de fibras nerviosas que parten de los nervios vago y simpático acompaña a los vasos sanguíneos (Dellmann *et al.*, 1980) e inervan elementos murales y vasculares (Banks, 1992). Las fibras nerviosas terminan también dentro del tejido tímico, concentrándose más en la médula y en la unión corticomedular (Dellmann *et al.*, 1980).

Un amplio arsenal de circuitos neuroendocrinos están interconectados con el timo y las interacciones neuroendocrinas tímicas son bidireccionales y se cree que éstas interacciones desempeñan un papel inmunomodulador importante durante una inmunorespuesta activa, durante la ontogenia del linfocito T y en el proceso del envejecimiento del organismo entero (Moll, 1998).

2.9. EVOLUCIÓN É INVOLUCIÓN.

El desarrollo del sistema inmunitario en el feto de los mamíferos sigue un patrón constante. El timo es el primer órgano linfoide en formarse (Tizard, 2002). La histogénesis del timo incluye 3 pasos importantes: colonización linfocítica, desarrollo del tejido conectivo trabéculas y la organización de las distintas regiones tímicas (Romano *et al.*, 1999a). En el bovino el período de gestación es de 280 días y el timo fetal ya puede reconocerse a los 40-42 días post concepción (Osburn *et al.*, 1982; Tizard, 2002), en el ovino el período de gestación es de 145 días y el timo fetal se identifica a los 35 días post concepción, en el porcino el período de gestación es de 115 días y el timo se desarrolla unos 40 días después de la concepción, en el equino el

período de gestación es de 340 días y el timo se observa entre 60 y 80 días post concepción, en el canino el período de gestación es de 60 días y el timo se diferencia entre los días 23 y 30 post concepción (Tizard, 2002).

El timo está completamente desarrollado al nacimiento y alcanza su máximo tamaño en la pubertad (Henrikson *et al.*, 1997) y luego sufre una involución acentuada (Henrikson *et al.*, 1997; Junqueira *et al.*, 1988). El timo disminuye de tamaño, peso y pierde su definición como órgano distintivo (Henrikson *et al.*, 1997), la pérdida de timocitos corticales (Banks, 1992) paulatinamente reduce la zona cortical (Junqueira *et al.*, 1988), la alteración tisular modifica la estructura lobulada del timo que es reemplazada por tejido conectivo adiposo (Henrikson *et al.*, 1997). Las células reticulares epiteliales y los corpúsculos de Hassal son más resistentes a la involución que los timocitos. El timo involuciona pero no desaparece (Junqueira *et al.*, 1988), en los rumiantes domésticos se mantiene como un remanente cubierto e infiltrado por tejido adiposo (Cunningham *et al.*, 2001; Espinoza-Chueca, 1995; Fernández, 1999).

El timo involucionado se mantiene como un órgano linfático funcional (Henrikson *et al.*, 1997) y cuando sus células son estimuladas, son capaces de reaccionar, aumentando la producción de timocitos (Junqueira *et al.*, 1988). Los datos demuestran que las células linfoides T no inmuoestimuladas ingresan constantemente a la reserva periférica de células T en similar proporción en todas las etapas fetal, neonatal y vida adulta (Cunningham *et al.*, 2001). Los macrófagos y células dendríticas son afectadas levemente por la edad (Varas *et al.*, 2003). La persistencia de células epiteliales primitivas morfológicamente no diferenciadas similares a aquellas encontradas en el primordio tímico temprano, también se encuentran en el timo adulto (Vicente *et al.*, 1998). Normalmente, exudan cantidades pequeñas de antígenos de la sangre, desde los capilares capsulares y subcapsulares, esto podría explicar el desarrollo de la involución (Sainte-Marie *et al.*, 2005).

Además de experimentar una involución relacionada con la edad, el timo puede sufrir una involución accidental, ya que es muy sensible a las radiaciones, infecciones y enfermedades prolongadas (Junqueira *et al.*, 1988) y podría regenerar a su tamaño anterior si la tensión es eliminada (Henrikson *et al.*, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Especímenes.

Para el presente estudio histológico se recolectaron 10 fetos entre 1,5 y 6,5 meses de edad aproximada, obtenidos de alpacas gestantes de descarte sacrificadas en el camal “Los Andes” de la ciudad de Huancayo a 3,350 msnm. (*Fig. 1*)

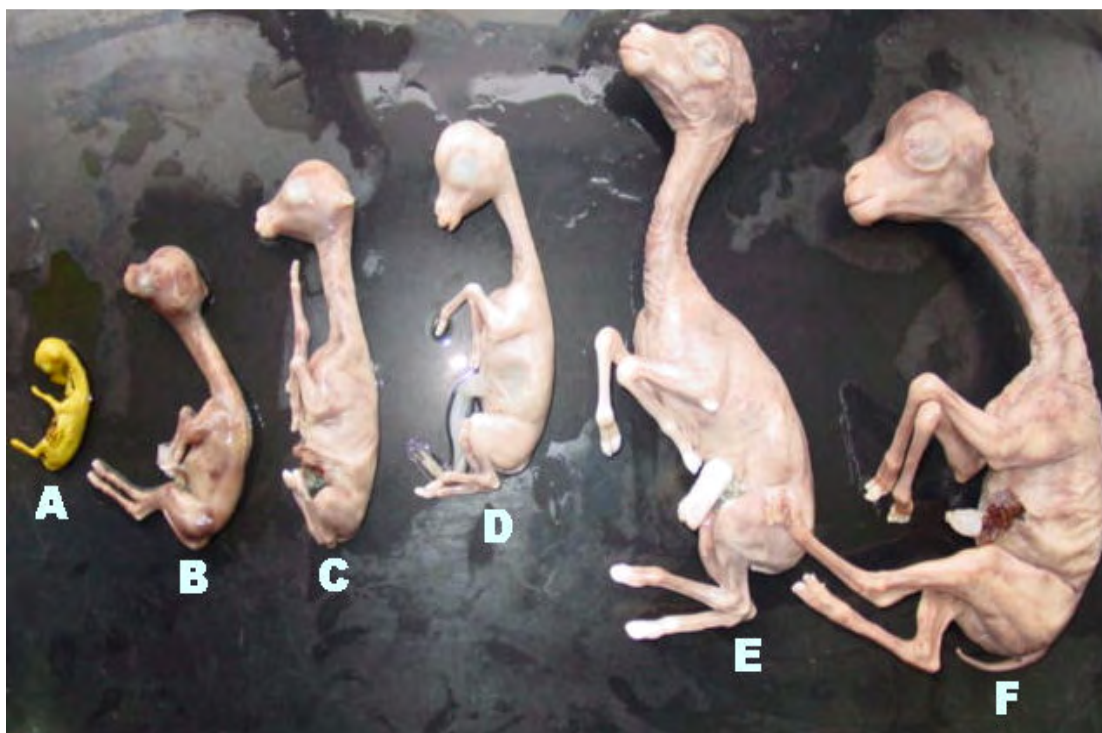


Figura 1. Edades Fetales: 40 días feto (A), 60 días feto (B), 100 días feto (C), 130 días feto (D), 165 días feto (E), 190 días feto (F).

3.1.2. Material de recolección, clasificación y disección de muestras.

Frascos de polietileno de boca ancha de 4 y 2 litros de capacidad, calibrador y/o caliper PRETUL de 5'', cinta métrica, pinzas, bisturís, hojas de afeitar y tijeras.

3.1.3. Material de fijación y procesamiento histológico.

- Formaldehído bufferado al 10% (fijador). (*Anexo 1*)
- Fijador Bouin (post fijador). (*Anexo 2*)
- Etanol absoluto, alcohol de 95%, xilol, agua desionizada, parafina en escamas.

3.1.4. Materiales de coloración.

- Tinción Hematoxilina-Eosina: para diferenciar el estroma y parénquima. (*Anexo 3*)

- Tinción de Wilder: tiñe de negro a las fibras reticulares y trama reticular. (*Anexo 4*)
- Tinción de Masson: tiñe de azul a las fibras colágenas. (*Anexo 5*)
- Tinción de Johnson: metacromasia, tiñe de rosado los gránulos de los mastocitos. (*Anexo 6*)

3.1.5. Material de microfotografía.

Microscopio biocular micrometrado óptico de luz incorporada Carl Zeiss (Axiostar), con cámara digital incorporada Resolución 6X, Cyber-shot 3.3 mega pixels, Sony ® model N° DSC-575.

3.1.6. Otros.

Láminas portaobjetos, láminas cubre objetos, y materiales de escritorio.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Procesamiento de especímenes.

Los 10 fetos obtenidos de las alpacas gestantes sacrificadas, fueron inmediatamente fijados en el camal, pero antes se les aplicó 2 piquetes con una tijera de bordes romos, uno en el tórax y otro en abdomen, y se les colocó en un frasco de boca ancha conteniendo 9 partes de formol bufferado al 10% y 1 del feto, para permitir la mejor difusión y fijación de órganos internos. Los fetos mayores de 4 meses fueron diseccionados, en la estación del IVITA Huancayo, para obtener secciones típicas colocándose estos en formol, en la proporción anteriormente mencionado (9:1).

3.2.2. Determinación de la edad fetal.

Con el objetivo de obtener la edad gestacional de los fetos en estudio, se utilizó como referencia las medidas biométricas fetales, las cuales siguen un patrón de desarrollo constante durante la etapa fetal, y así poder determinar la edad gestacional del feto de alpaca. Las referencias anteriores consideradas fueron las utilizadas por Gazitua *et al* (2001) y Fowler (1998) quienes determinaron la edad fetal en función del diámetro biparietal fetal.

- **Diámetro biparietal fetal (BPD).**- Medida transversal al eje occipitofrontal, es el espacio virtual entre los lados externos de los huesos temporoparietales del cráneo del feto de la alpaca (*Fig. 2*).



Figura 2. Feto de 60 días de edad: medida de su diámetro biparietal usando el caliper.

Obtenida ésta medida en cm., se aplicó a la fórmula para obtener la edad en días:

$$\text{Edad gestacional} = (\text{BPD} - 0.11376)47.23287, \quad r = 0.98, \quad P < 0.001 \quad (\text{Gazitua et al, 2001})$$

r: coeficiente de regresión y P: significancia

Deacuerdo a ésta fórmula, obtuvimos las edades aproximadas de los fetos recolectados (*Tabla 1*).

Tabla 1: Edad gestacional del feto según medida del diámetro biparietal.

FETO	D. Biparietal (cm.)	Edad (días)	Edad (meses)
A-1	1,00	41,85966	1,39532196
B-2	1,30	56,02952	1,86765066
C-3	2,20	98,5391	3,28463676
D-4	2,25	100,9007	3,36335821
E-8	2,75	124,5172	4,15057271
F-9	3,10	141,0487	4,70162286
G-12	3,60	164,6651	5,48883736
H-13	3,70	169,3884	5,64628026
I-16	4,10	188,2816	6,27605186
J-17	4,10	188,2816	6,27605186

3.2.3. Obtención de las muestras del timo.

Para la ubicación del timo se tomó como referencia la descripción anatómico topográfica realizada por Sisson *et al.* (2000); Popesko (1990) y Machado *et al.* (2001) en otras especies rumiantes domésticas. Se usaron 2 técnicas, dependiendo de la edad del feto. En fetos mayores de 4 meses se diseccionó el timo “*in situ*”, y se obtuvo secciones transversales del órgano en un promedio de 6 a 8, por medio de cortes seriados de la porción cervical y torácica para el estudio histológico. En fetos menores de 4 meses, al ser el tejido fetal una estructura muy frágil y difícil de diseccionar, sólo para estudios histológicos, se realizó una post fijación en Bouin (24-48 horas), para producir una suave induración de los tejidos blandos y “descalcificación” de las vértebras cervicales y torácicas, y de éste modo pudimos obtener cortes o secciones transversales a lo largo del cuello y entrada del tórax (Montalvo, 1987; Popesko, 1990) y en éstas se obtuvo tejido tímico minimizando el riesgo de alterarlo o desgarrarlo (*Fig. 3*).



Figura 3. Feto de 60 días de edad: Feto post fijado en Bouin para obtener cortes seriados de la región cervical y entrada del mediastino.

3.2.4. Muestra tomada.

En fetos mayores de 4 meses: secciones de tejido tímico de 0,5 cm. de largo x 0,25 cm. de grosor.

En fetos menores de 4 meses: secciones de cuello y región torácica de 0,25 cm. de grosor y 0,50 cm. de diámetro.

3.2.5. Procesamiento histológico.

Los especímenes fueron fijados en proporción de 9 : 1 respecto a la muestra, con formol bufferado al 10%, el cual tiene la propiedad de además de mantener estable la estructura de los tejidos, éste conserva mejor sus determinantes bioquímicos y propiedades antigénicas de superficie celular. Luego las muestras fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Reproducción de la estación IVITA Huancayo para su pre clasificación y luego al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria, para su post fijación en fijador Bouin (fetos de 2 a 4 meses), y posterior procesamiento histológico.

- a) Reducción y lavado.
- b) Deshidratación y parafinado (en la máquina automática: autotecnico).
- c) Inclusión en parafina.
- d) Corte de las muestras en el micrótopo a un grosor aproximado de 7 a 10 micras.
- e) Tinciones de Hematoxilina-Eosina, Masson, Wilder y Johnson.

3.2.6. Lectura histológica.

Se evaluó histológicamente la organización citoestructural del timo fetal de la alpaca en tres secciones (2 cervicales: anterior y posterior, y 1 torácica) de los fetos que se estratificaron en 6 etapas etarias, basándose en la determinación de las edades aproximadas (*Tabla 1*). Además, se determinó un promedio aritmético del diámetro del timocito que puebla la región cortical y medular respectivamente, de la sección torácica del órgano, en aquellos fetos que presentaron una diferenciación citoestructural definida, estos timocitos fueron tomados aleatoriamente (n=30) para cada región tímica (*Tabla 2*).

3.2.7. Fotografiado de láminas histológicas.

Se realizó utilizando una cámara digital incorporada al microscopio, descritos anteriormente.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la disección de los fetos mayores de 4 meses (*Tabla 1*) para mostrar la ubicación anatómica del timo, comprobando la distribución del órgano a lo largo de toda la región cervical siguiendo una disposición de craneal a caudal desde el arco mandibular hasta el mediastino anterior (*Fig. 4*), (*Fig. 5*). El timo está contiguo a ambos lados (derecho e izquierdo) de la tráquea en su recorrido cervical, y el lado izquierdo se relaciona al esófago. El timo cervical es de un color crema blanquecino y su forma anatómica es largo aplanado en forma de “Y”, ya que en el tercio caudal de la región cervical se “unen” las 2 ramas que nacen desde ambos arcos mandibulares (*Fig. 6*), para dar un tronco común que llega hasta el mediastino, donde el timo toma morfología piriforme de consistencia más firme y de apariencia lobular (*Fig. 7*). Cabe acotar que el lado derecho del timo cervical siempre fue más pequeño en relación de 1:2 con su lado homólogo izquierdo lo que dificultó su disección. En los fetos menores de 4 meses (*Tabla 1*) no se diseccionó la parte cervical por lo delicado y frágil que es el órgano, sin embargo en el feto de aproximadamente 60 días se pudo observar y diseccionar la parte torácica del timo, el cual se ubicó en el mediastino anterior craneal a los atrios del corazón, siendo una estructura de forma piramidal de 4 x 3 mm. de consistencia gelatinosa de aspecto brillante y coloración blanco nacarado.

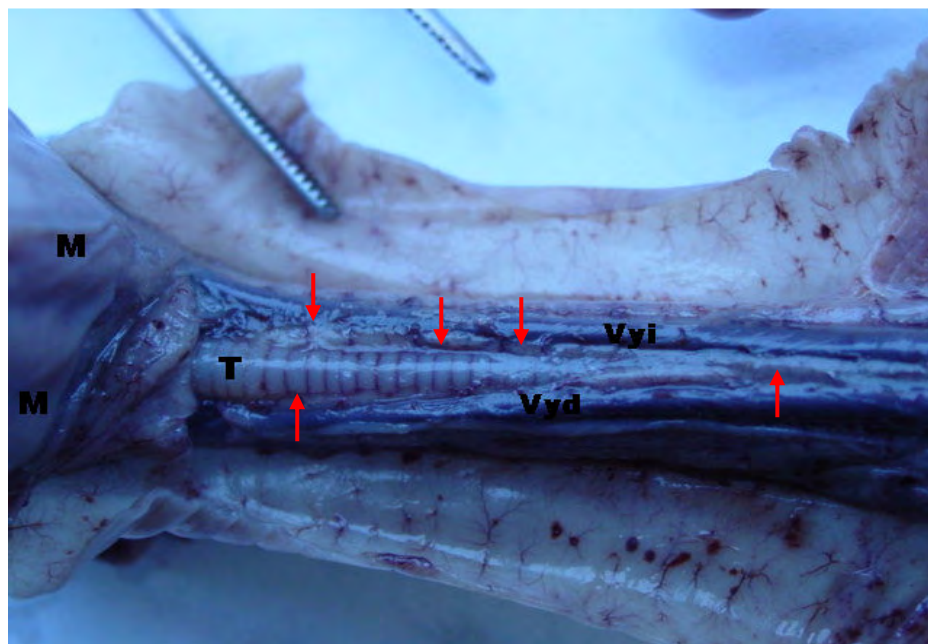


Figura 4. Feto de 165 días de edad: Exposición del timo (área cervical anterior). Área mandibular (M), tráquea (T), vena yugular izquierda (Vyi), vena yugular derecha (Vyd), timo cervical (flechas).

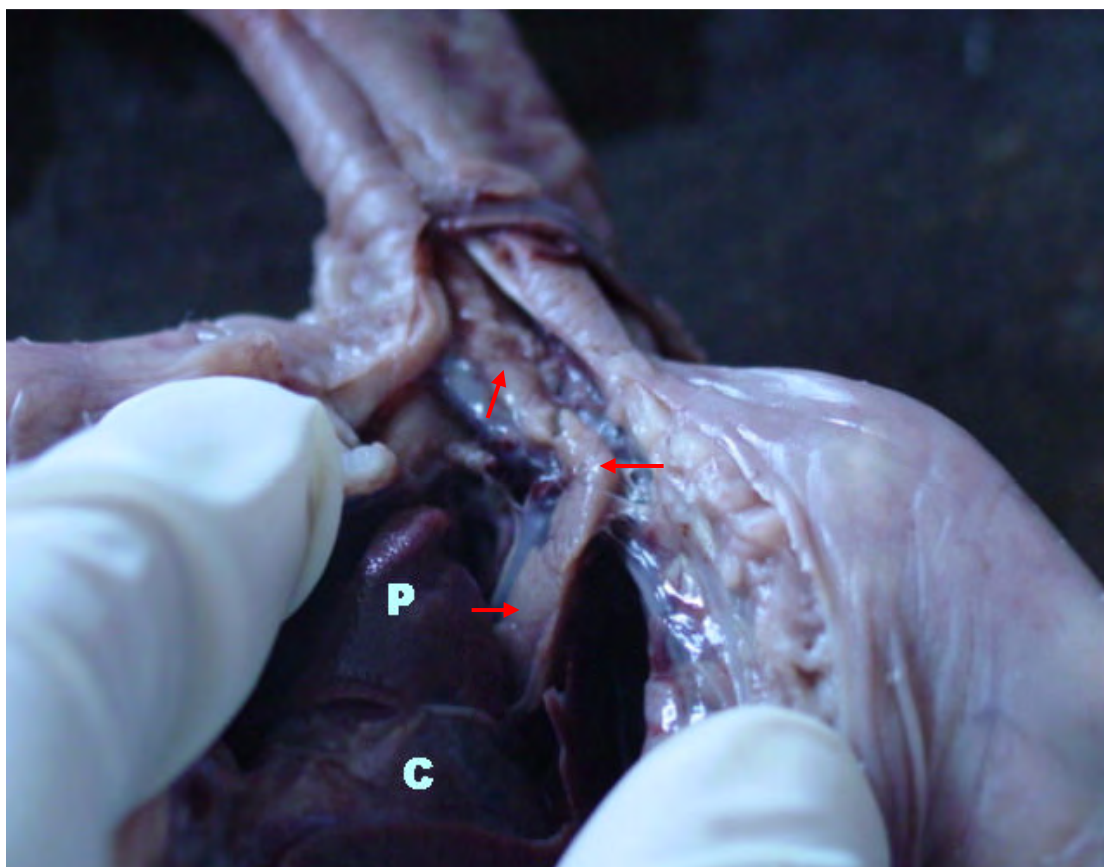


Figura 5. Feto de 190 días de edad: Entrada del timo cervical al mediastino. Pulmón (P), corazón (C), timo (flechas).

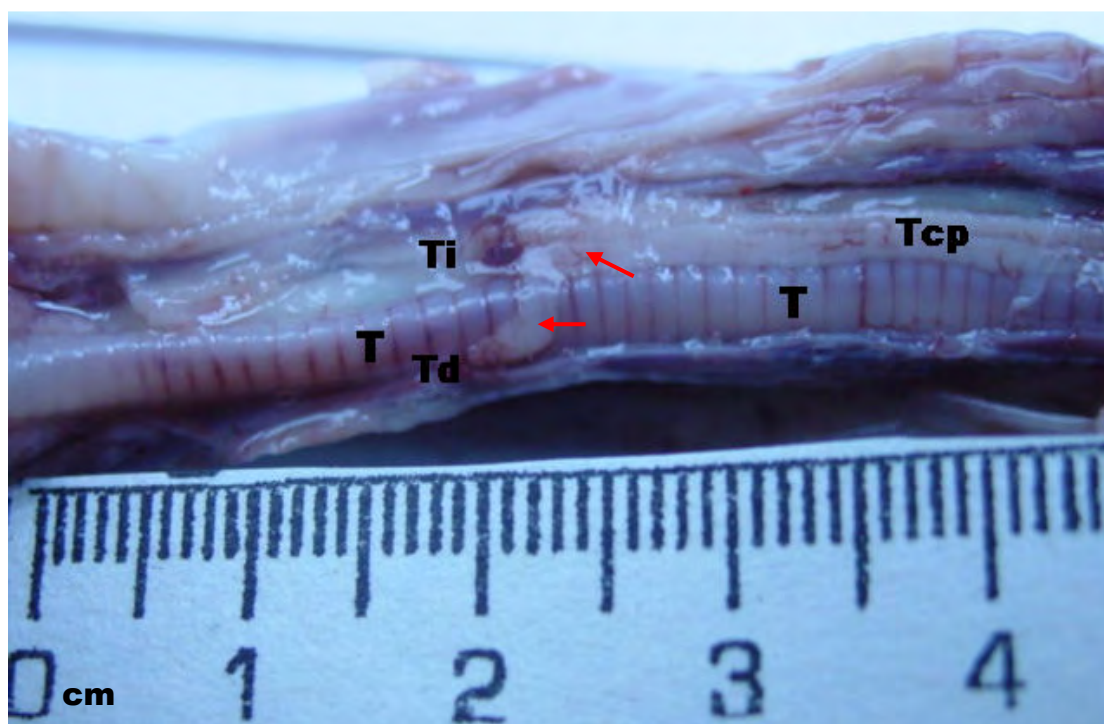


Figura 6. Feto de 165 días de edad: Unión de las 2 porciones cervicales izquierda y derecha, en el tercio distal de la región cervical. Tráquea (T), timo cervical anterior izquierdo (Ti), timo cervical anterior derecho (Td), timo cervical posterior (rama única) (Tcp), puente de unión entre las regiones anteriores y posterior (istmo) (flechas).

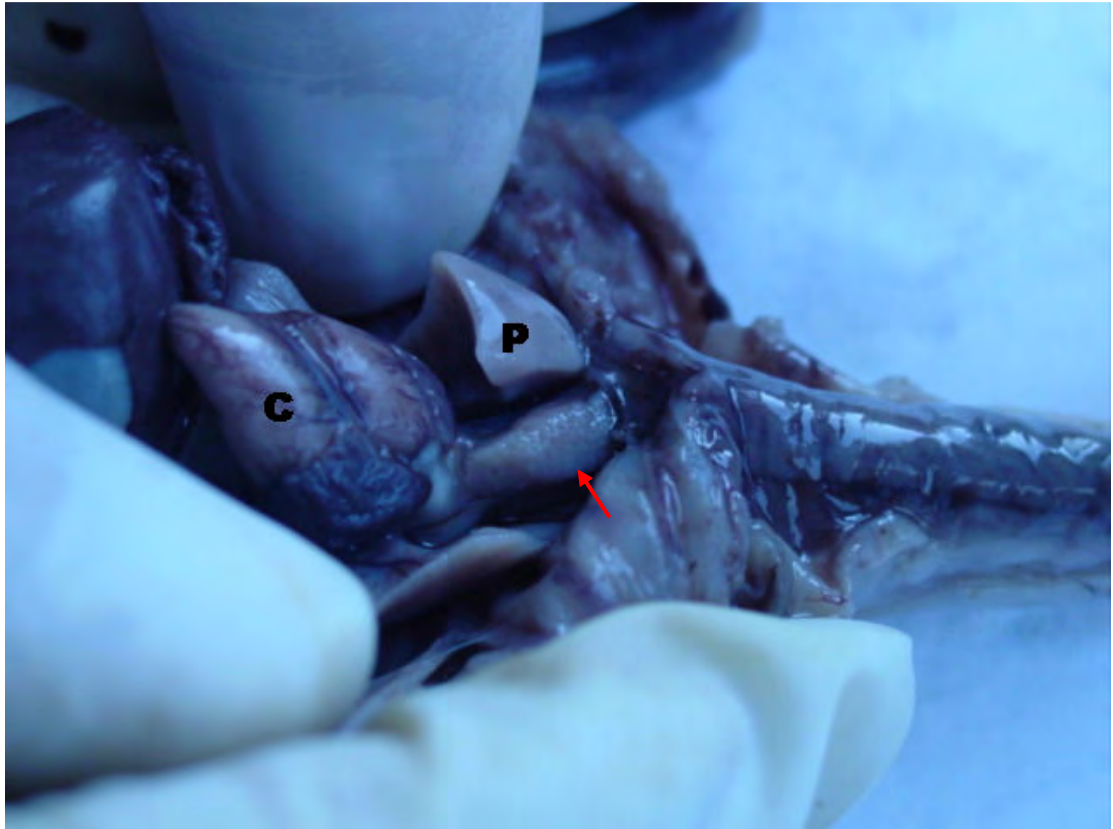


Figura 7. Feto de 130 días de edad: Timo en la cavidad mediastínica de morfología piriforme y apariencia lobular. Pulmón (P), corazón (C), timo (flecha).

4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA.

A continuación se describe el desarrollo de la conformación citoarquitectural tímica clasificada en 6 etapas etareas.

4.1.1. EDAD FETAL: 40 días.

En el esbozo del timo, **la porción anterior** se presenta como una organización de células reticulares epiteliales poliédricas de núcleos basófilos a manera de cordones y acinos, tomando una apariencia glandular infiltrado por vasos sanguíneos, se puede observar una fina capa de tejido conjuntivo que comienza a cubrir el esbozo, y que a su vez está rodeado por células mesenquimales (*Fig. 8*).

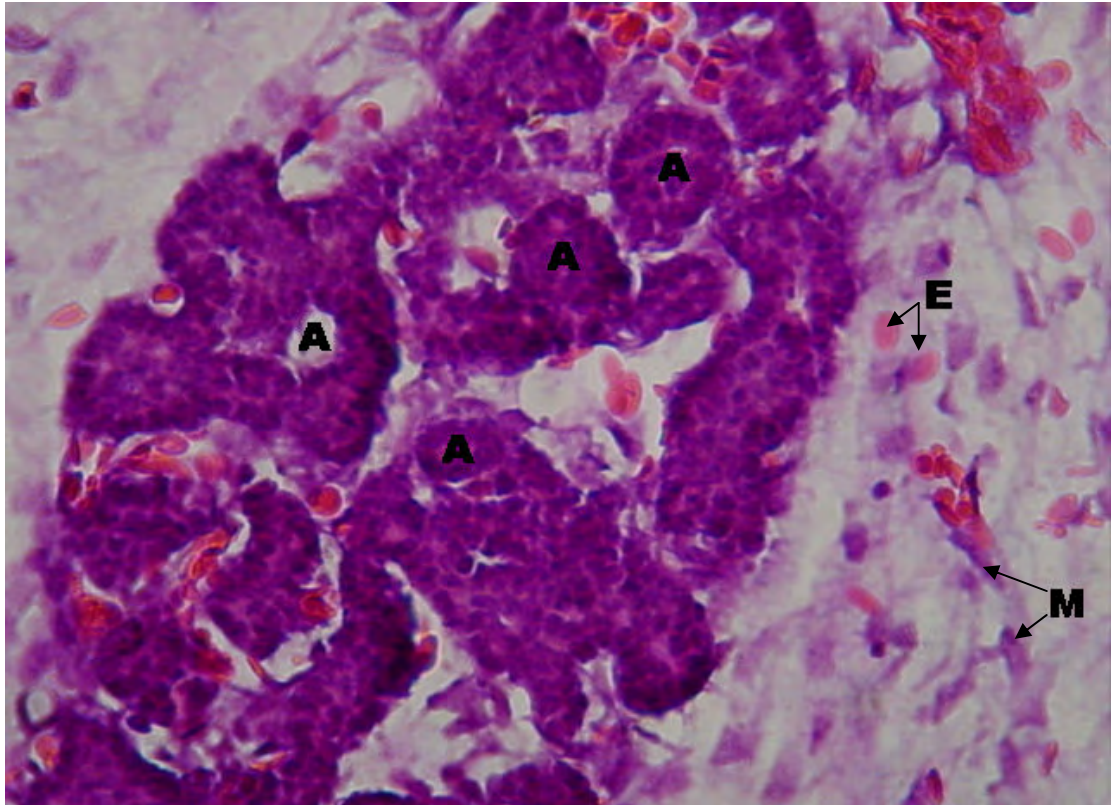


Figura 8. Feto de 40 días de edad: Esbozo del timo rodeado por células mesenquimales (M), organización de las células reticulares epiteliales a manera de cordones y acinos (A) infiltrados por vasos sanguíneos. Eritrocitos (E). H-E 400X.

La **porción media** presenta una trama reticular dispersa, integrada por células reticulares epiteliales, de morfología cuboidal, de núcleos prominentes y coloración basófila, y en su citoplasma evidencian vacuolas; tales células se agrupan formando cordones a manera de acinos, que en **los segmentos posteriores** se evidencia con una escasa infiltración de células redondas de núcleo esférico y basófilos con escaso citoplasma compatibles con linfocitos (*Fig 9*), (*Fig. 10*).

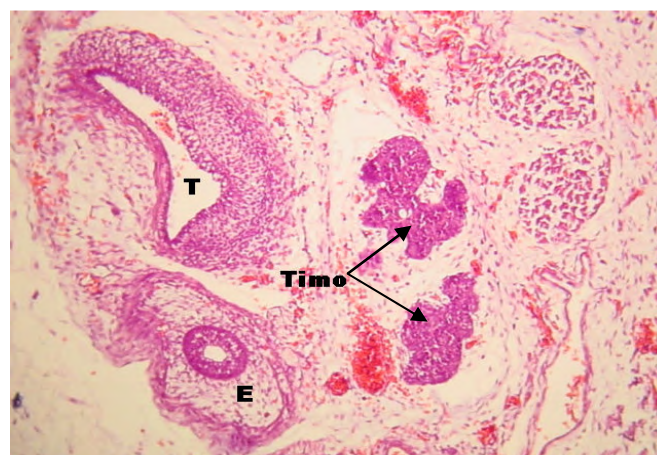


Figura 9. Feto de 40 días de edad: Esbozos tímicos de la región cervical posterior. Tráquea (T), esófago (E). H-E 100X.

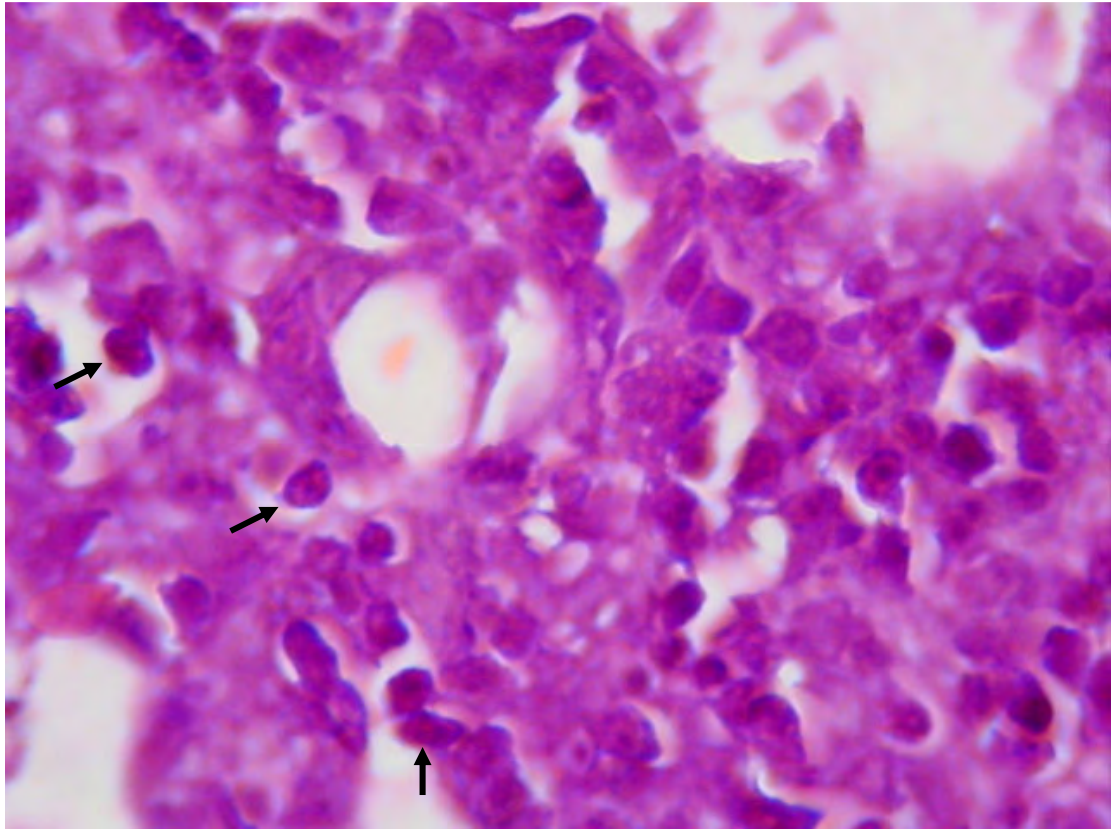


Figura 10. Feto de 40 días: Conglomerado de las células reticulares epiteliales (disposición con aparentes gránulos y vacuolas citoplasmáticas), a su vez aparecen algunas células compatibles con linfocitos (flechas). H-E 1000X.

En ésta edad fetal, las escasas células compatibles con linfocitos que se midieron tuvieron en promedio una medida diametral de 3,9 micras.

4.1.2. EDAD FETAL: 60 días.

El esbozo tímico se presenta en su **porción cervical anterior** como un sólo “folículo linfoide” densamente poblado por timocitos, infiltrado por vasos sanguíneos desde la zona periférica hacia la zona central del esbozo (*Fig. 11*). Rodeando este esbozo se observó fibras de tejido conjuntivo que tienden a delimitar una cápsula muy fina compuesta por 2 capas celulares. En el área adyacente al esbozo se observan múltiples células mesenquimales dispuestas periféricamente, así como los vasos sanguíneos pletorizados y contiguas a estos, células linfoides y granulocíticas indiferenciadas.

La sección torácica muestra una organizaciónseudolobulillar indiferenciada, aparentando un “órgano cavitario” con infiltración de trabéculas de tejido conjuntivo

laxo, que no dividen totalmente a los aislados acumulos de timocitos dispuestos muy laxamente entre abundantes vasos sanguíneos tortuosos pletorizados (*Fig. 12*).

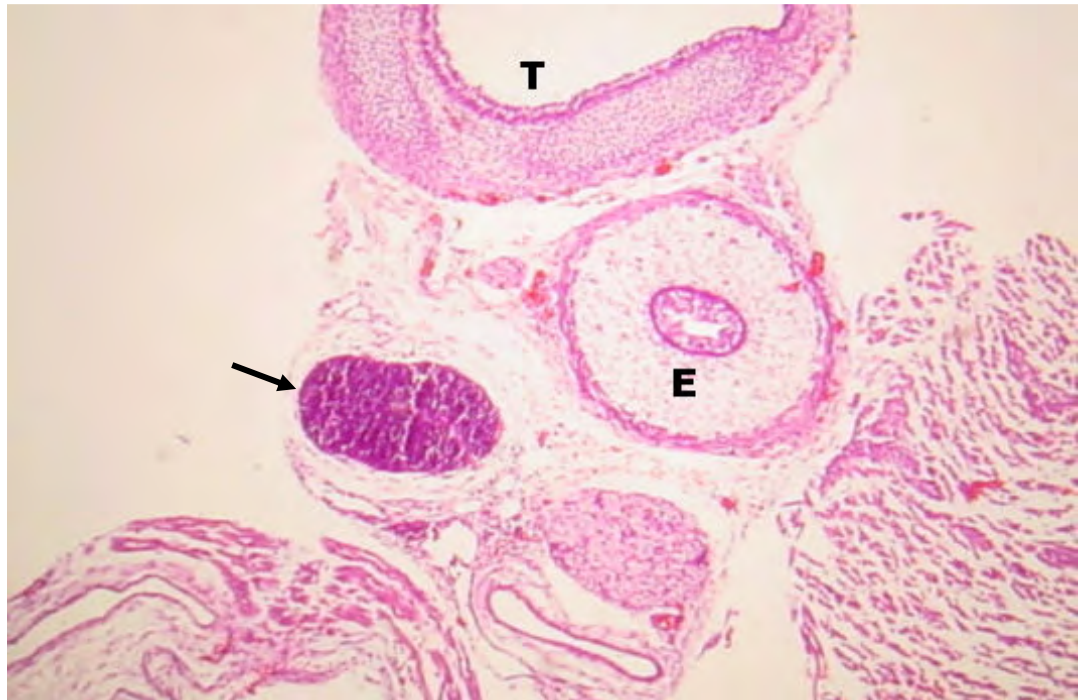


Figura 11. Feto de 60 días: Corte transversal de la región cervical anterior. Primordios del esófago (E), tráquea (T), timo (flecha). H-E 50X.

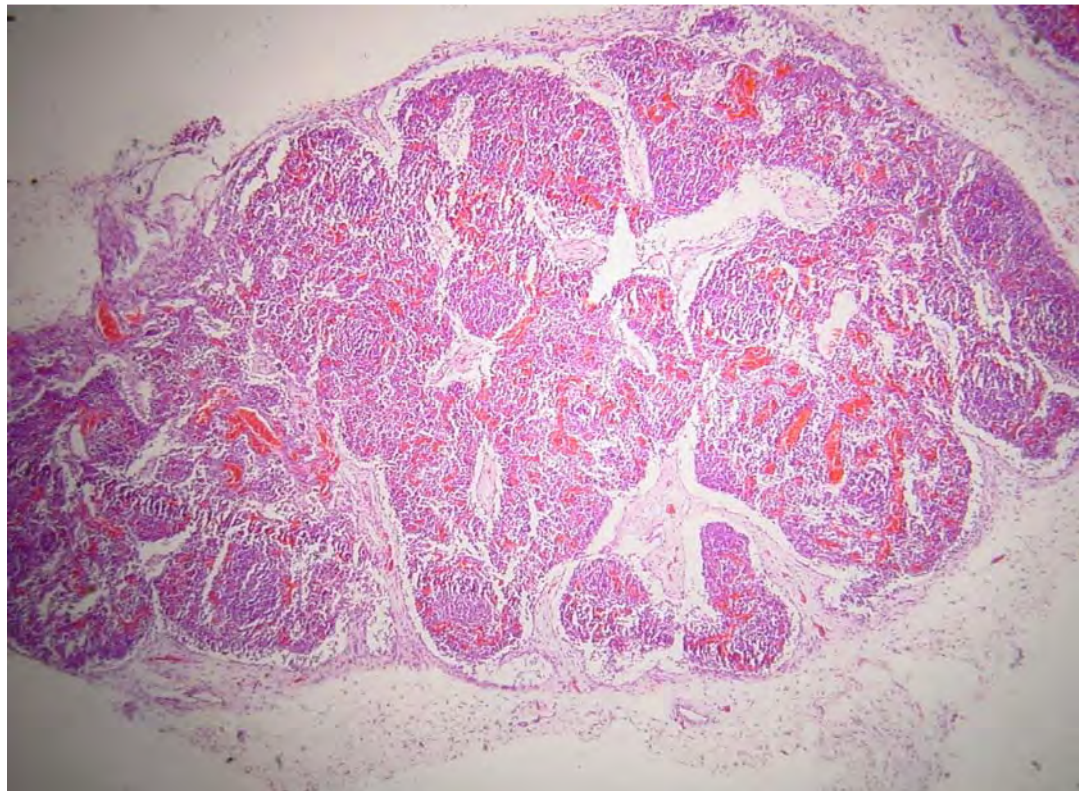


Figura 12. Feto de 60 días: Corte longitudinal de la región torácica. "Órgano cavitario", donde no se observa conformación característica de corteza y médula, se aprecian múltiples vasos sanguíneos pletorizados y trabéculas que tienden a dividir la estructura para formar pseudolobulillos. H-E 100X.

La cápsula se muestra engrosada, formada por fibras de tejido conjuntivo y 3 a 4 capas celulares de fibroblastos y células mesenquimales. Desde la cápsula, las trabéculas se infiltran hacia la zona central del esbozo, dividiéndolo en “cavidades tímicas”. Las células reticulares epiteliales están laxamente dispuestas de forma aleatoria dentro de las “cavidades tímicas” y evidencian sus prolongaciones citoplasmáticas en el parénquima como finas líneas reticulocelulares; algunas células reticulares epiteliales están bordeando los vasos sanguíneos (*Fig. 13*).

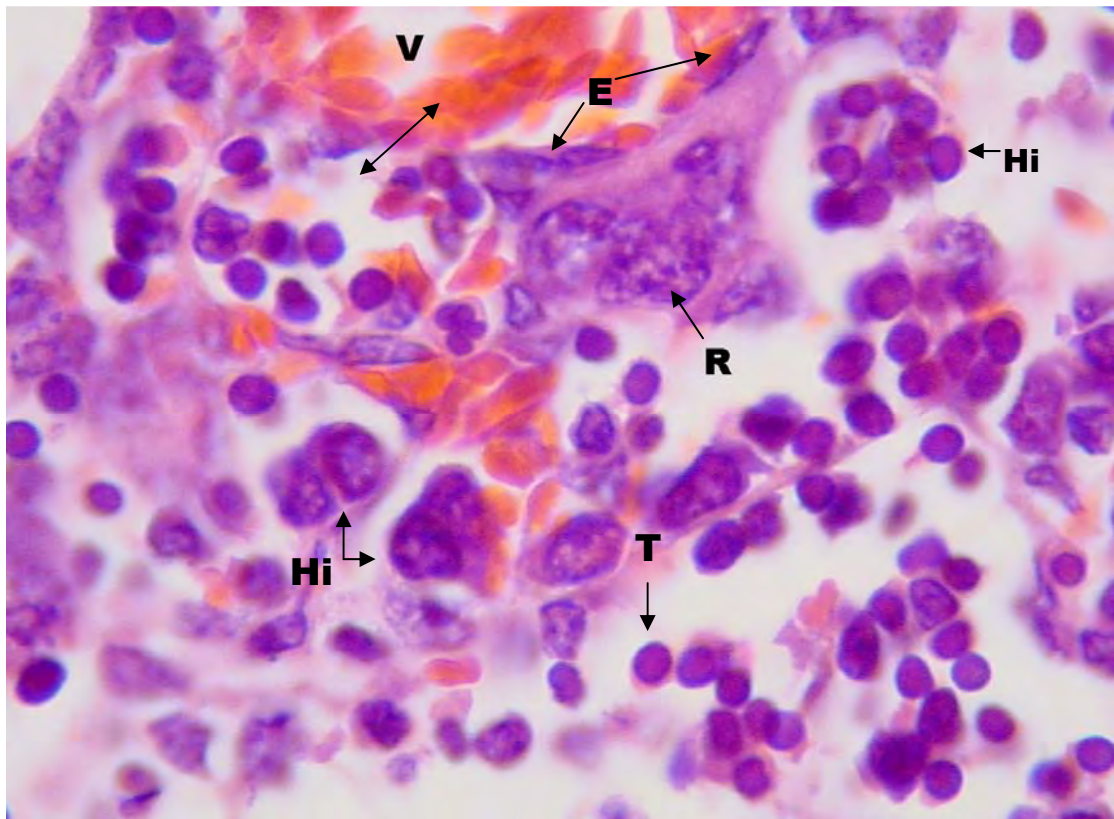


Figura 13. Feto de 60 días: Corte de la sección torácica. Célula reticular epitelial (R) abrazando un vaso sanguíneo pletozizado (V) con endotelio plano (E) fenestrado (\leftrightarrow), además se observan timocitos (T) y células hematopoyéticas indiferenciadas diseminados en el parénquima (Hi). H-E 1000X.

Dentro del parénquima y cercano a los vasos sanguíneos tortuosos se encuentran escasos nidos de células hematopoyéticas indiferenciadas.

En ésta edad fetal los timocitos dispersos en el tejido en desarrollo tuvieron en promedio una medida diametral de 4,2 micras.

4.1.3. EDAD FETAL: 100 días.

La **sección cervical anterior** del esbozo tímico se observa como un “fóliculo linfoide” densamente poblado por timocitos, y cubierto por una cápsula compuesta por doble capa de tejido conjuntivo laxo y 2 capas celulares de fibroblastos (*Fig. 14*); subcapsularmente, se encuentran vasos sanguíneos fenestrados y pletorizados. La región externa del parénquima “folicular” evidencia las células reticulares epiteliales limitantes y bajo éstas, entremezclado con los timocitos, ocasionalmente se observan algunos eritrocitos y células de núcleo basófilo arriñonado compatibles con monocitos.

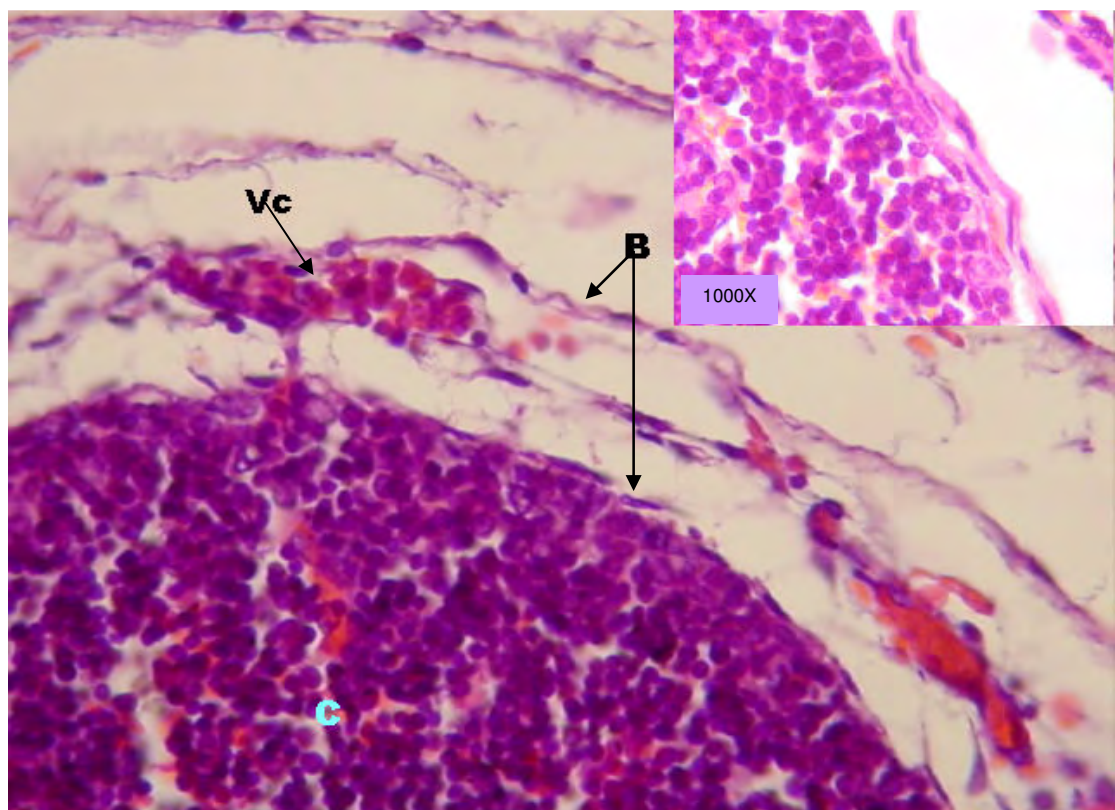


Figura 14. Feto de 100 días: Sección cervical. Bicapa capsular (B), cubriendo la “corteza” tímica (C), también se observa un vaso sanguíneo subcapsular con endotelio fenestrado (Vc). H-E 400X. Imagen superior derecha mostrando 2 capas celulares capsulares.

La **porción cervical posterior**, evidencia una tenue diferenciación del lobulillo entre corteza y médula, ésta última aparece centralmente como una zona muy reducida y más clara (menos poblada por timocitos). Rodeando ésta zona se encuentran escasos vasos sanguíneos delimitando la no muy definida área medular de la cortical. La disposición de la zona capsular en algunas zonas se compone hasta de 3 capas celulares, compuestas por fibroblastos y fibrocitos y el tejido conjuntivo más denso.

La región externa del lobulillo está tapizada por células reticulares epiteliales limitantes y bajo éstas se observan los timocitos densamente dispuestos y algunos monocitos. En la zona medular, se observan los timocitos dispuestos en menor densidad y los haces de prolongaciones de las células reticulares epiteliales medulares son evidentes, los vasos sanguíneos de pequeño calibre están rodeados por células reticulares epiteliales y en algunas áreas se observan escasos eritrocitos diseminados en el parénquima. En algunas zonas subcapsulares y corticales periféricas se agrupan células hematopoyéticas indiferenciadas compatibles con rubroblastos (*Fig. 15*).

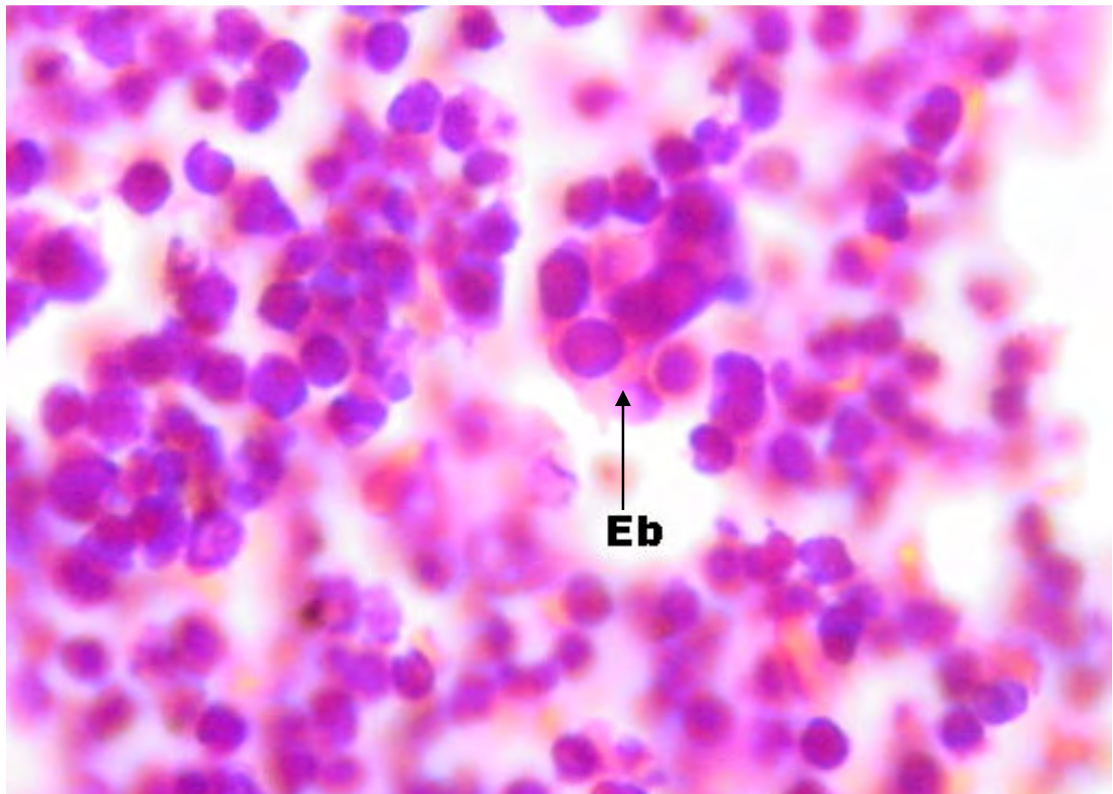


Figura 15. Feto de 100 días: Sección cervical posterior. Grupo de células eritroblásticas (Eb) en parénquima "cortical" periférico, de núcleos prominentes y basófilos, evidenciando presencia de agregaciones nucleares sugiriendo los nucleolos compatibles con rubroblastos. Rodeadas por múltiples timocitos. H-E 1000X.

La porción torácica muestra lobulillos que comparten una médula común bien diferenciada, debido a que las trabéculas que parten de la zona capsular no delimitan totalmente las zonas corticales y menos las medulares. Los vasos sanguíneos corticomedulares son evidentes y delimitan la zona medular de la cortical (*Fig. 16*). La cápsula compuesta de tejido conjuntivo laxo, se vuelve más fina. En las zonas trabeculares se encuentran fibroblastos, células mesenquimales, vasos sanguíneos fenestrados y pletorizados, así mismo en áreas muy cercanos a estos vasos sanguíneos

se observan células polimorfonucleares y nidos de células hematopoyéticas indiferenciadas (*Fig. 17*).

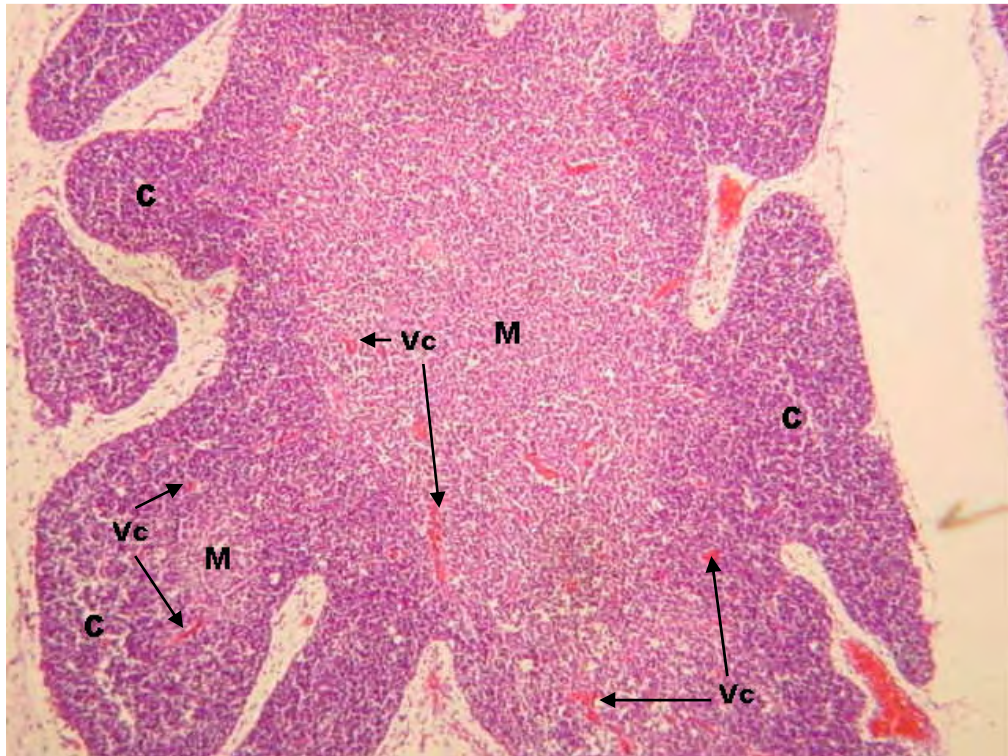


Figura 16. Feto de 100 días: Sección torácica. Conformación pseudolobulillar diferenciada en corteza (C) y médula (M). Los vasos sanguíneos corticomedulares (Vc) se ubican entre corteza y médula. H-E 50X.

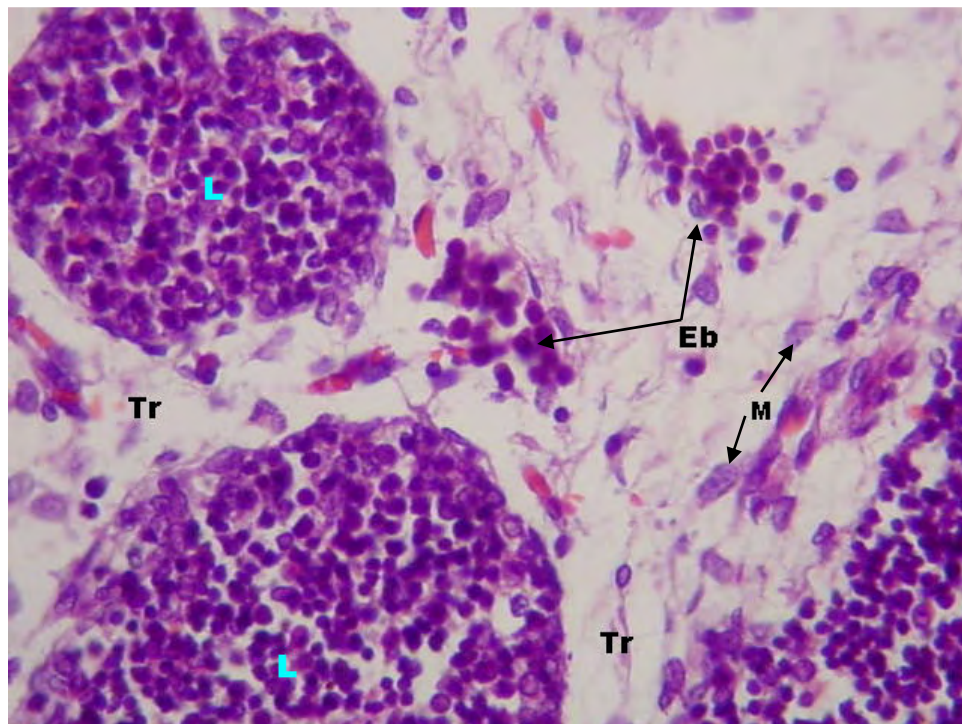


Figura 17. Feto de 100 días: Sección torácica. Grupos de células eritroblásticas (Eb) ubicadas en áreas trabeculares (Tr). Células mesenquimales (M), lobulillos (L). H-E 400X.

En la zona cortical periférica bajo la cápsula se observan las células reticulares epiteliales limitantes (*Fig. 18*) y en el área cortical se muestran ocasionalmente entre los timocitos densamente dispuestos, algunas células reticulares epiteliales corticales y macrófagos (*Fig. 19*). En la zona medular son evidentes las células reticulares epiteliales medulares mostrando sus prolongaciones citoplasmáticas y entre éstas los timocitos. Los vasos sanguíneos medulares pletozados, son bordeados por las células reticulares epiteliales, además se encuentran algunos eritrocitos diseminados en el parénquima. A éste nivel ya se encuentran células reticulares epiteliales medulares en estado degenerativo, rodeando una sustancia anhistá, evidenciando la formación de los corpúsculos de Hassal (*Fig. 20*).

A ésta edad fetal la medida diametral de los timocitos dispuestos en el tejido tímico, se muestran en (*Tabla 2*).

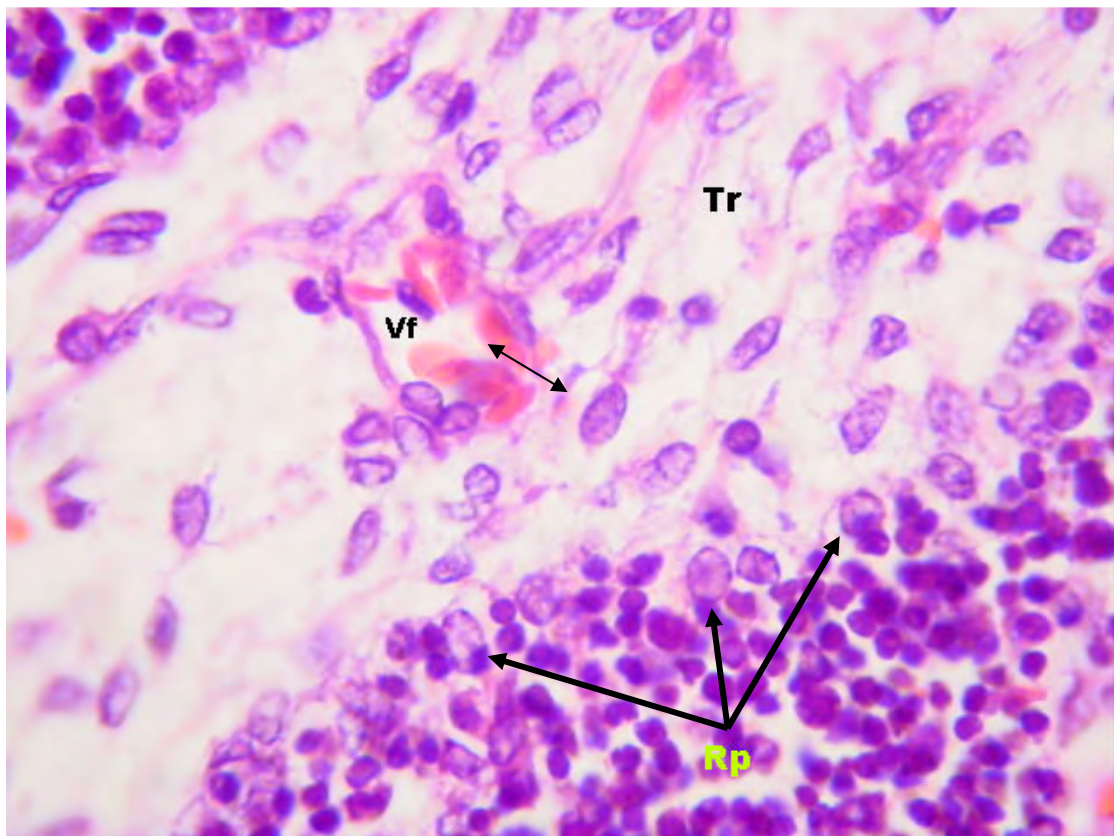


Figura 18. Feto de 100 días: Sección torácica. Células reticulares epiteliales limitantes (Rp) tapizando la superficie cortical tímica. Área Trabécular (Tr). Vaso sanguíneo (Vf) con endotelio fenestrado (\leftrightarrow). H-E 1000X.

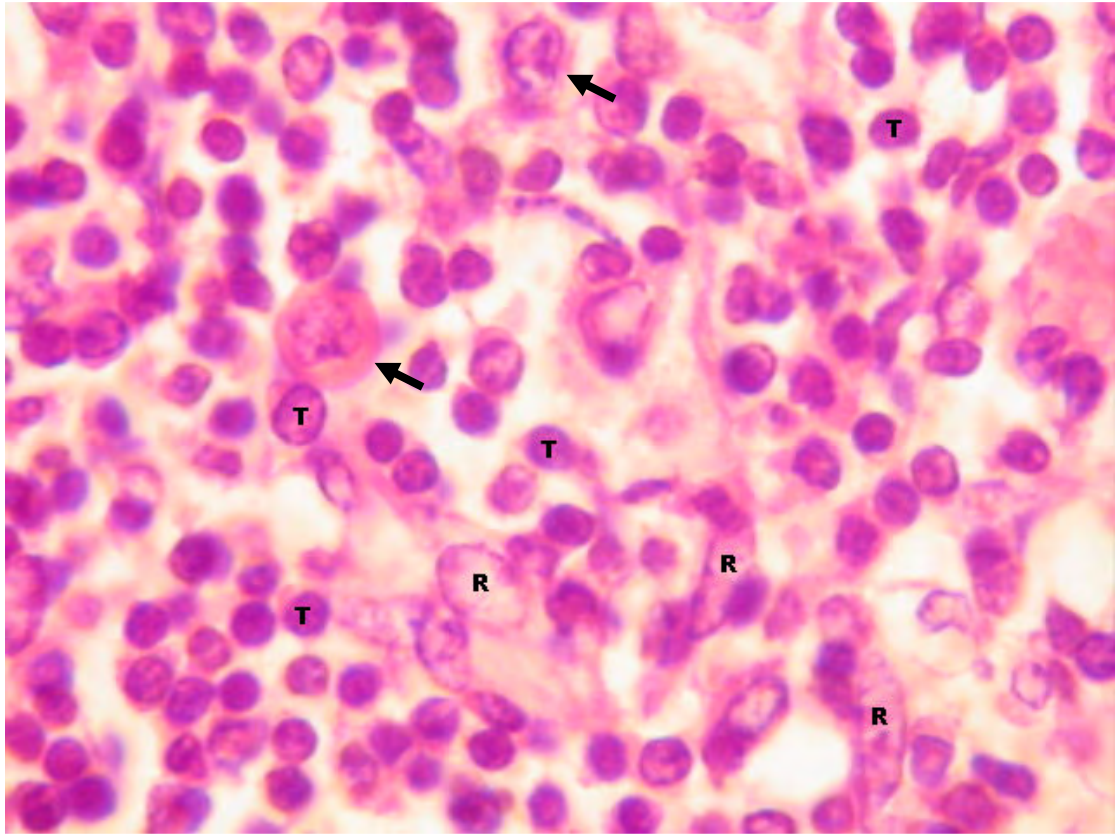


Figura 19. Feto de 100 días: Sección torácica. Zona cortical no muy densamente poblada donde se observan timocitos (T), células reticulares epiteliales corticales (R) y macrófagos (flechas). H-E x 1000X.

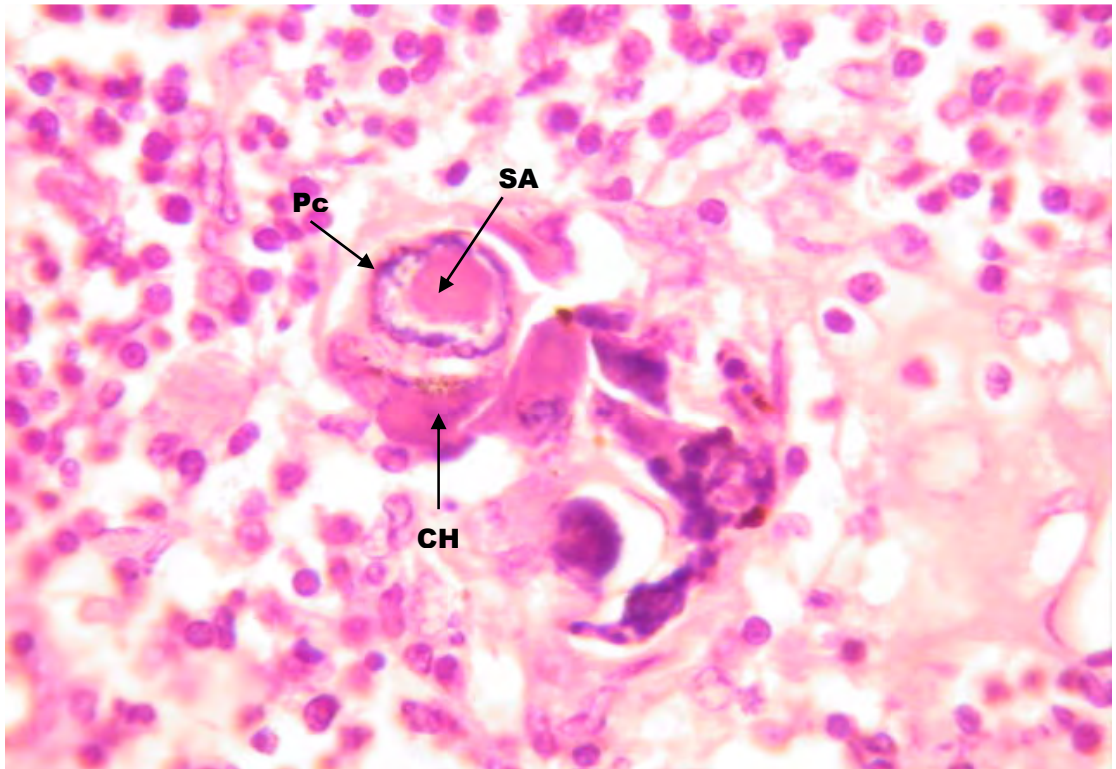


Figura 20. Feto de 100 días: Sección torácica. Corpúsculo de Hassal (CH) en zona medular, nótese las células reticulares epiteliales degeneradas con pigmentos citoplasmáticos (Pc) basófilos circundando sustancia anhista (SA). H-E 1000X.

4.1.4. EDAD FETAL: 130 días.

La sección cervical anterior del esbozo tímico ya muestra lobulaciones pero aún no definidas en corteza y médula, por lo tanto, estos “lobulillos” se presentan indiferenciados y están densamente poblado por timocitos. El tejido conjuntivo adyacente al esbozo, es de tipo laxo, con fibroblastos y células mesenquimales. Dicho esbozo está cubierto por una fina cápsula compuesta principalmente por 2 capas celulares de fibrocitos y algunos fibroblastos. Las trabéculas que dividen los “lobulillos” también están conformadas por tejido conjuntivo laxo. Los vasos sanguíneos subcapsulares y trabeculares se encuentran pletorizados y fenestrados, y cercanos a estos se aprecian a diferentes tipos de células polimorfonucleares de la línea blanca y células de citoplasma granular como mastocitos. En algunas zonas subcapsulares, trabeculares y periféricas del tejido “lobulillar” se observaron grupos celulares de células hematopoyéticas indiferenciadas. El parénquima “lobulillar” está revestido por las células reticulares epiteliales limitantes y bajo ésta línea celular se encuentran los timocitos densamente dispuestos en el parénquima, y también se observan ocasionalmente macrófagos, así como periféricamente algunos eritrocitos. La zona más interna o central del “lobulillo” está conformada por escasas células reticulares epiteliales y los vasos sanguíneos se encuentran pletorizados y rodeadas por células reticulares epiteliales.

En la **porción cervical posterior**, ya se puede definir los lobulillos, debido a la evidencia de una diferenciación entre corteza y médula, siendo ésta última un área más laxa y clara rodeada por múltiples vasos sanguíneos pletorizados de la zona corticomedular, manteniendo su conformación y distribución en cuanto a los otros componentes tisulares similar al segmento tímico anterior.

La porción torácica, se distribuye en múltiples lobulillos delimitados por trabéculas de tejido conjuntivo laxo (*Fig. 21*), los lobulillos presentan una diferenciación de una zona laxa central más clara (médula) y otra densa periférica más oscura (corteza), entre éstas dos zonas se ubican múltiples vasos sanguíneos pletorizados (vasos sanguíneos corticomedulares). La cápsula está compuesta de tejido conjuntivo laxo y 2 capas celulares de fibrocitos. Principalmente, en la zona subcapsular y trabécula se aprecian células mesenquimales, fibroblastos, vasos sanguíneos fenestrados y pletorizados, así como múltiples células libres de la línea blanca como

polimorfonucleares y mononucleares, grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados, y células de citoplasma granular como mastocitos (*Fig. 22*).

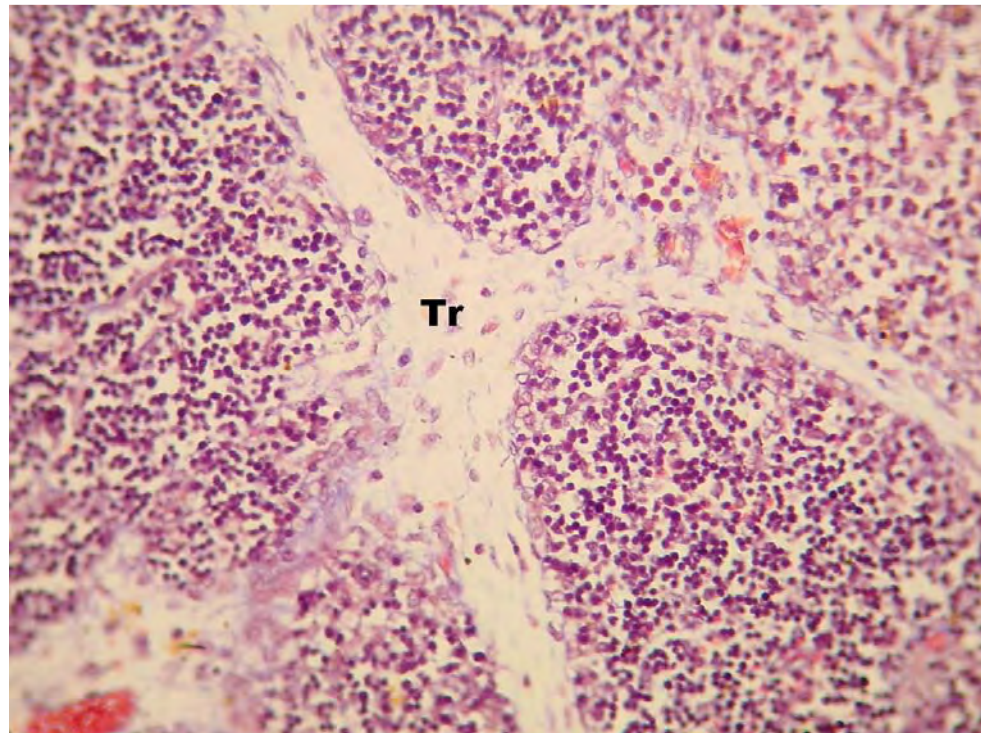


Figura 21. Feto de 130 días: Sección torácica. Área trabécular (Tr), presentando fibras colágenas de color azul. T. de Masson 400X.

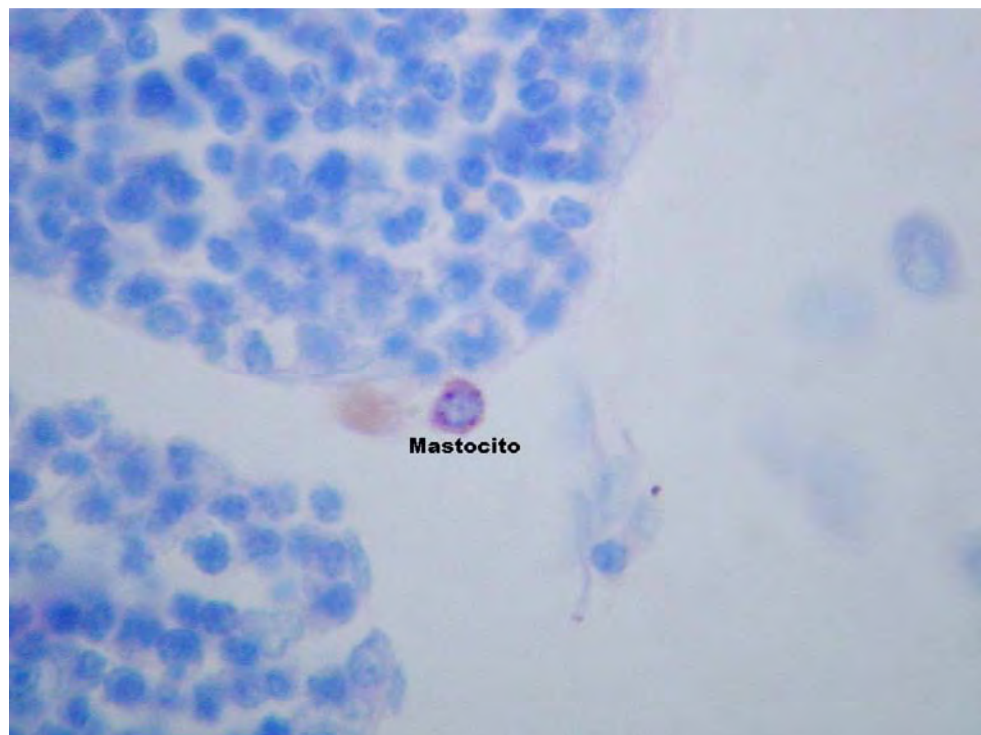


Figura 22. Feto de 130 días: Sección torácica. Área trabécular mostrando una célula con gránulos citoplasmáticos de color rosado (mastocito). T. de Johnson 1000X.

La corteza está revestida por células reticulares epiteliales limitantes y bajo éstas, se aprecian los timocitos densamente dispuestos en el parénquima y escasos vasos sanguíneos; ocasionalmente se observan macrófagos. En la zona medular, se observa algunos macrófagos y células reticulares epiteliales medulares proyectando sus prolongaciones citoplasmáticas en el espacio tisular rodeando a los timocitos (*Fig. 23*), así como, células reticulares epiteliales medulares en degeneración con citoplasma acidofilo con pigmentos basófilos agrupadas concéntricamente rodeando una sustancia anhistá de tinción eosinofila, y núcleo basófilo débil con cromatina dispersa, lo cual evidencian los corpúsculos de Hassal. En la zona cortico medular se aprecian células reticulares epiteliales estrechamente relacionadas formando una barrera celular y próximas a éstas algunos timocitos (*Fig. 24*).

A ésta edad fetal la medida diametral de los timocitos dispuestos en el tejido tímico, se muestran en (*Tabla 2*).

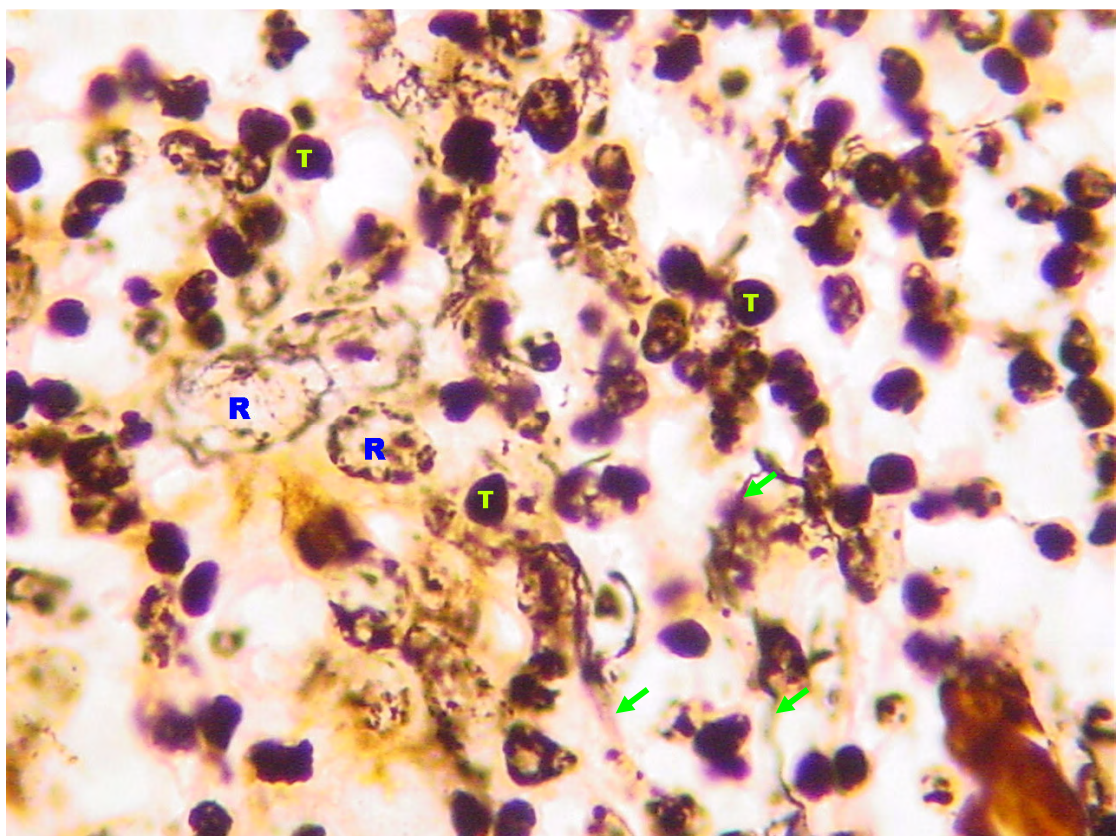


Figura 23. Feto de 130 días: Vista de la trama reticular de color negro (flechas), conformada por las prolongaciones citoplasmáticas de las células reticulares epiteliales (R). Timocitos (T). T. de Wilder 1000X.

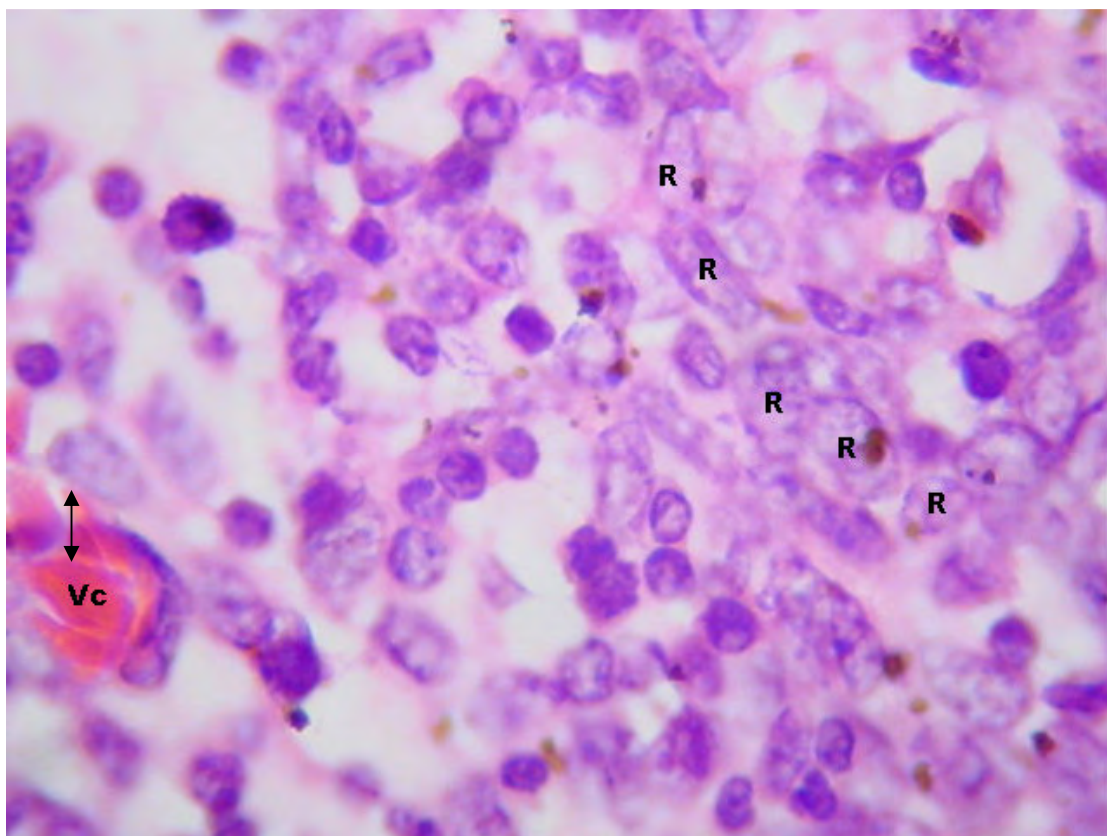


Figura 24. Feto de 130 días: Células reticulares epiteliales (R) dispuestas en fila, conformando una barrera en la zona corticomedular. Vaso sanguíneo corticomedular (Vc) con endotelio fenestrado (\leftrightarrow). H-E 1000X.

4.1.5. EDAD FETAL: 165 días.

La **sección cervical anterior** del esbozo tímico se muestra con lobulillos bien definidos en 2 zonas, una cortical densa y otra medular laxa (*Fig. 25*). La cápsula es fina, compuesta por tejido conjuntivo laxo y 2 capas de fibrocitos. A nivel subcapsular, se encuentran vasos sanguíneos fenestrados pletorizados y cercano a estos se ubican células libres como polimorfonucleares, mononucleares, eritrocitos y grupos de células hematopoyéticas indiferenciadas. Algunos lobulillos presentan médula común, ya que las trabéculas que ingresan desde la zona capsular no delimitan las zonas medulares; las trabéculas están compuestas de tejido conjuntivo laxo y se pueden encontrar algunas células mesenquimales libres en el espacio trabecular. En la periferia de la zona cortical, se encuentran las células reticulares epiteliales limitantes dispuestas secuencialmente tapizando la zona cortical.



Figura 25. Feto de 165 días: Sección cervical anterior. Lobulillos (L) definidos en corteza (C) y médula (M). Zonas trabeculares (Tr), vasos sanguíneos corticomedulares (flechas). H-E 50X.

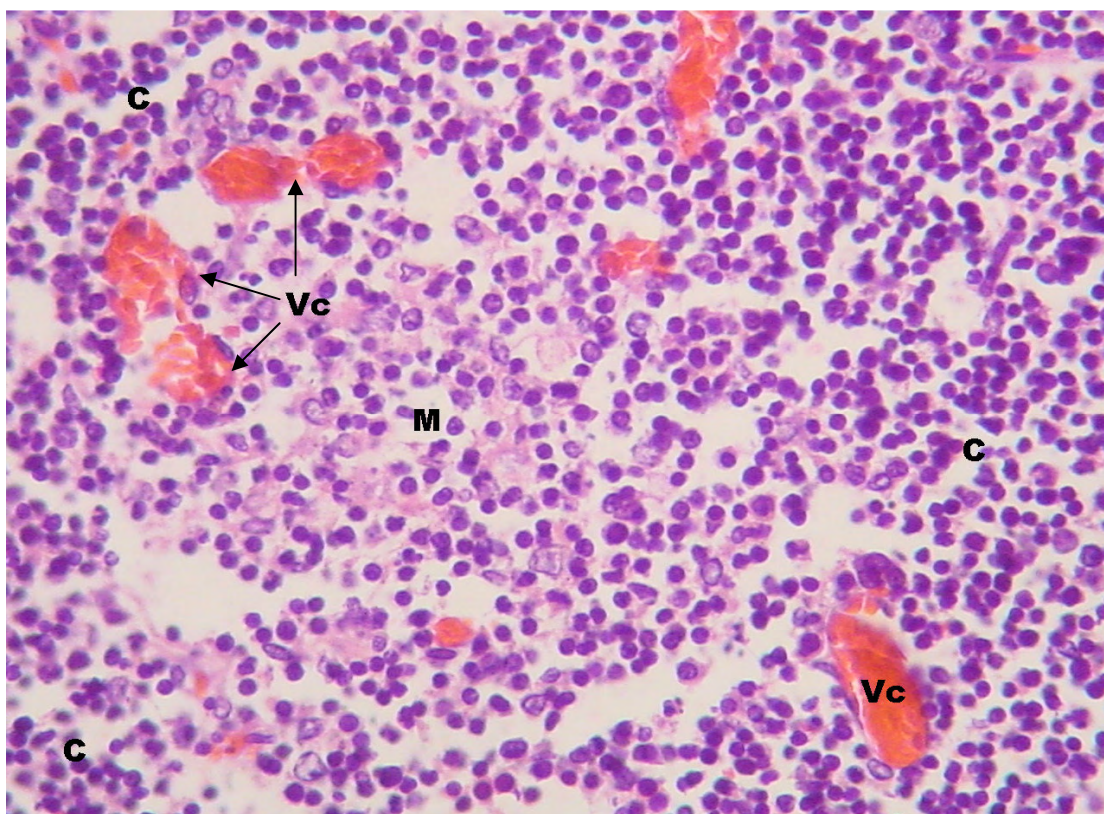


Figura 26. Feto de 165 días: Sección cervical anterior. Vasos corticomedulares pletorizados (Vc) limitando la zona cortical (C) y la zona medular (M). H-E 400X.

Los timocitos dispuestos en forma densa y ocasionalmente se logra observar células reticulares epiteliales corticales en el parénquima cortical y rodeando los vasos sanguíneos corticales. La zona medular evidencia claramente las células reticulares epiteliales medulares rodeando con sus prolongaciones citoplasmáticas a los timocitos que se encuentran laxamente distribuidos, los vasos sanguíneos medulares están pletorizados y rodeados por células reticulares epiteliales. En la zona corticomedular en algunos sectores se pueden apreciar a las células reticulares epiteliales agrupándose en número de 3 a 4 formando una especie de barrera celular. Los vasos sanguíneos corticomedulares se encuentran pletorizados conteniendo eritrocitos (*Fig. 26*).

En la sección cervical posterior los lobulillos también se encuentran definidos en corteza y médula. La cápsula está compuesta celularmente de manera similar a la sección anterior, y subcapsularmente se aprecian eritrocitos diseminados y grupos de células hematopoyéticas indiferenciadas. Algunos lobulillos están compartiendo una médula común y los vasos sanguíneos corticomedulares pletorizados están siendo rodeados por algunas células reticulares epiteliales, estos vasos sanguíneos que delimitan la corteza de la médula, se encuentran en mayor número que la sección tímica anterior. En la zona medular, se observó a las células reticulares epiteliales medulares en proceso de degeneración, dispuestas concéntricamente sobre una sustancia anhistia evidenciando los corpúsculos de Hassal, también se aprecia algunos macrófagos en el parénquima medular.

En la sección torácica, los lobulillos están definidos de manera similar a la cervical en corteza y médula. La zona cortical densamente poblada por timocitos y la médula laxamente poblada por timocitos, los vasos sanguíneos corticomedulares pletorizados se distribuyen claramente y delimitan ambas zonas. Los lobulillos presentan médula común, ya que las proyecciones trabeculares no confluyen totalmente hasta la zona central medular. Las trabéculas están compuestas de tejido conjuntivo laxo y algunos fibroblastos y fibrocitos. La cápsula es muy fina y está conformada por tejido conjuntivo laxo y 1 o 2 capas de fibrocitos. Subcapsularmente y en las zonas trabeculares se aprecian vasos sanguíneos fenestrados pletorizados y cercanos a estos se encuentran algunos eritrocitos, polimorfonucleares, mononucleares y grupos de células hematopoyéticas indiferenciadas (*Fig. 27*), así como algunas células mesenquimales, fibroblastos y granulares como mastocitos (*Fig. 28*).

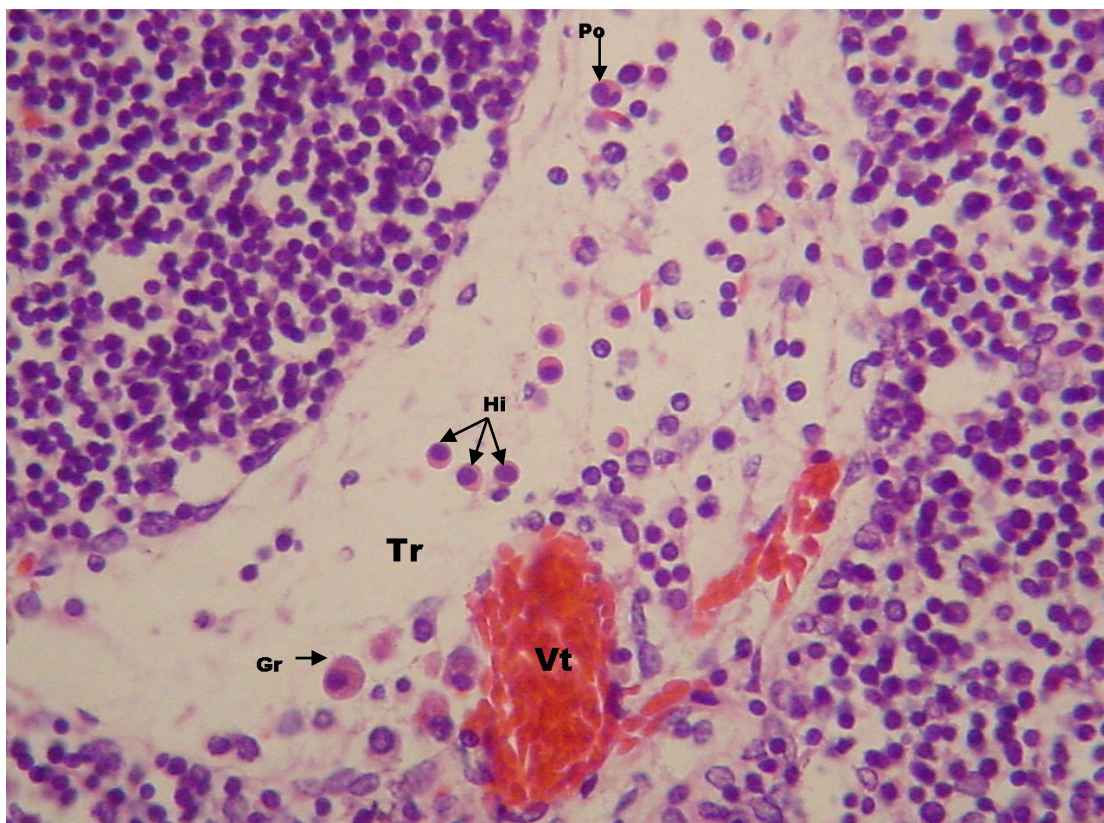


Figura 27. Feto de 165 días: Sección torácica. Área trabécular (Tr), donde se encuentran libres varios tipos celulares de la línea mieloide: compatibles con mieloblasto eosinófilo (Gr), metamielocito (Po), hematopoyéticas indiferenciadas (Hi). Vaso sanguíneo trabécular pletozizado (Vt). H-E 400X.

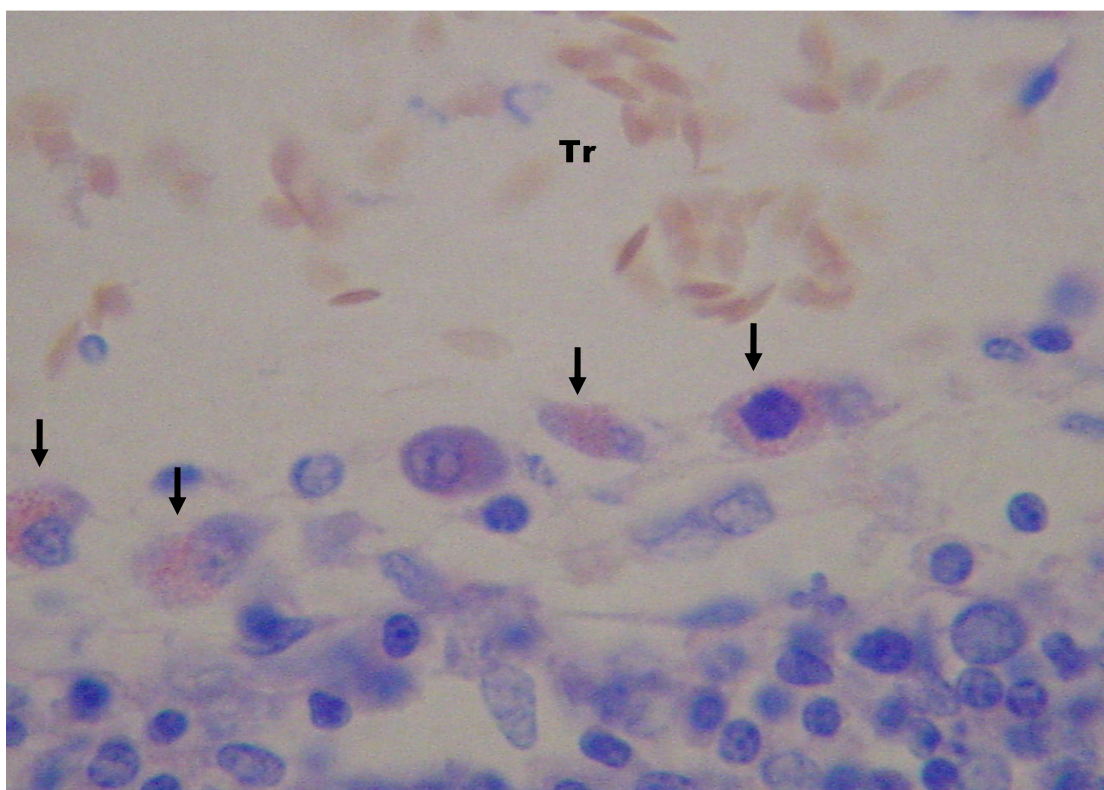


Figura 28. Feto de 165 días: Sección torácica. Área trabécular (Tr), mostrando células con gránulos citoplasmáticos de color rosado (mastocitos) (flechas). T. de Johnson 1000X.

En la zona cortical se observó las células reticulares epiteliales limitantes que tapizan la corteza y bajo éstas se encuentran los timocitos muy densamente dispuestos en el parénquima, los vasos sanguíneos son escasos y se pueden apreciar periféricamente grupos aislados de células hematopoyéticas indiferenciadas. La zona medular es más laxa y evidencia las células reticulares epiteliales medulares dispuestas en el parénquima formando tramas celulares rodeando a los timocitos. Los vasos sanguíneos medulares se encuentran pletorizados y son rodeados por algunas células reticulares epiteliales. Distribuidos aleatoriamente se observan el agrupamiento de células reticulares epiteliales medulares en degeneración formando los corpúsculos de Hassal, como también algunos macrófagos.

A ésta edad fetal la medida diametral de los timocitos dispuestos en el tejido tímico, se muestran en (*Tabla 2*).

4.1.6. EDAD FETAL: 190 días.

La sección cervical anterior, muestra los lobulillos bien definidos en corteza y médula, citoarquitecturalmente caracterizados de manera similar a lo descrito en la edad fetal de 165 días. La cápsula está compuesta de tejido conjuntivo laxo y con 1 o 2 capas celulares de fibrocitos o fibroblastos. Subcapsularmente y en las trabéculas se aprecian abundantes vasos sanguíneos fenestrados pletorizados mostrando alrededor de estos muchos tipos celulares de la línea mieloide, algunos linfocitos y eritrocitos (*Fig. 29*), así como grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados de la línea roja (*Fig. 30*). La corteza está delimitada por células reticulares epiteliales limitantes, bajo ellas los timocitos dispuestos densamente en el parénquima, en algunas zonas periféricas se agrupan células hematopoyéticas indiferenciadas. La zona medular es más laxa y se observan en mayor número, acumulos de células reticulares epiteliales medulares en degeneración agrupadas concéntricamente sobre una sustancia anhistal central, evidenciando los corpúsculos de Hassal.

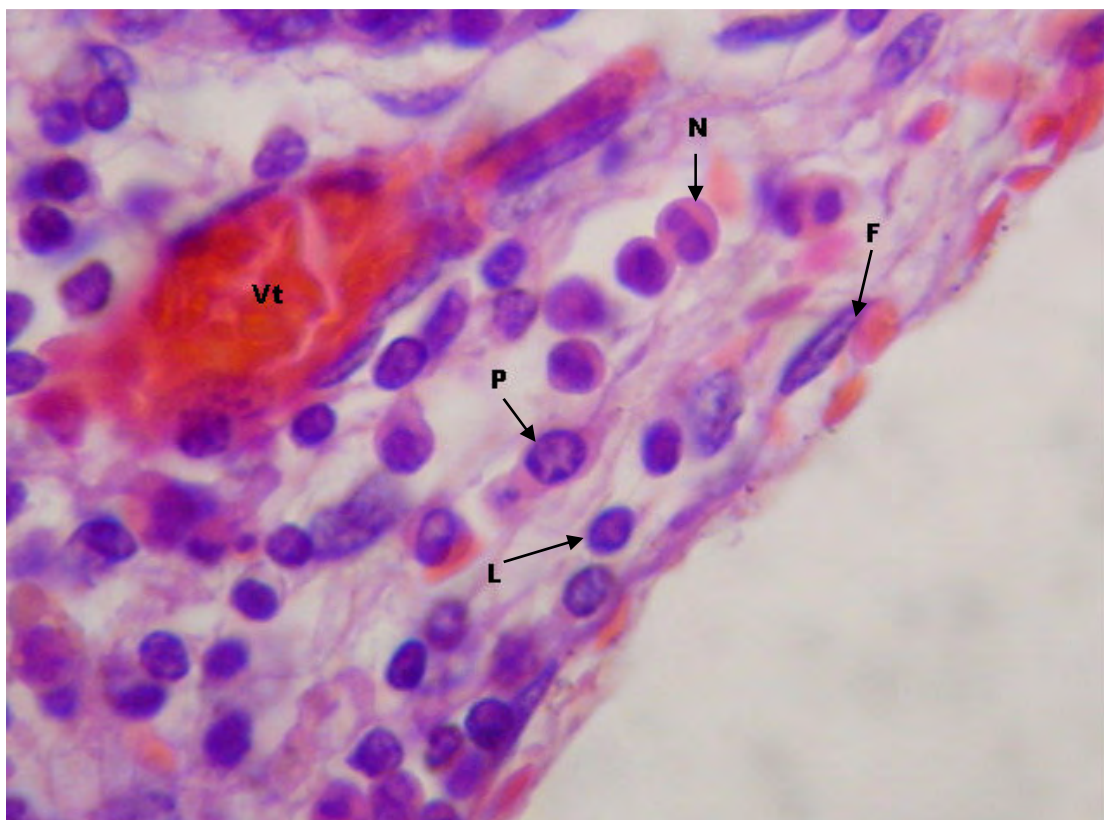


Figura 29. Feto de 190 días: Sección cervical anterior. Área trabécular interlobulillar mostrando tipos celulares compatibles con plasmocito (P), metamielocito (N), linfocito (L), fibrocito (F). Vaso sanguíneo trabécular pleotorizado fenestrado (Vt). H-E 1000X.

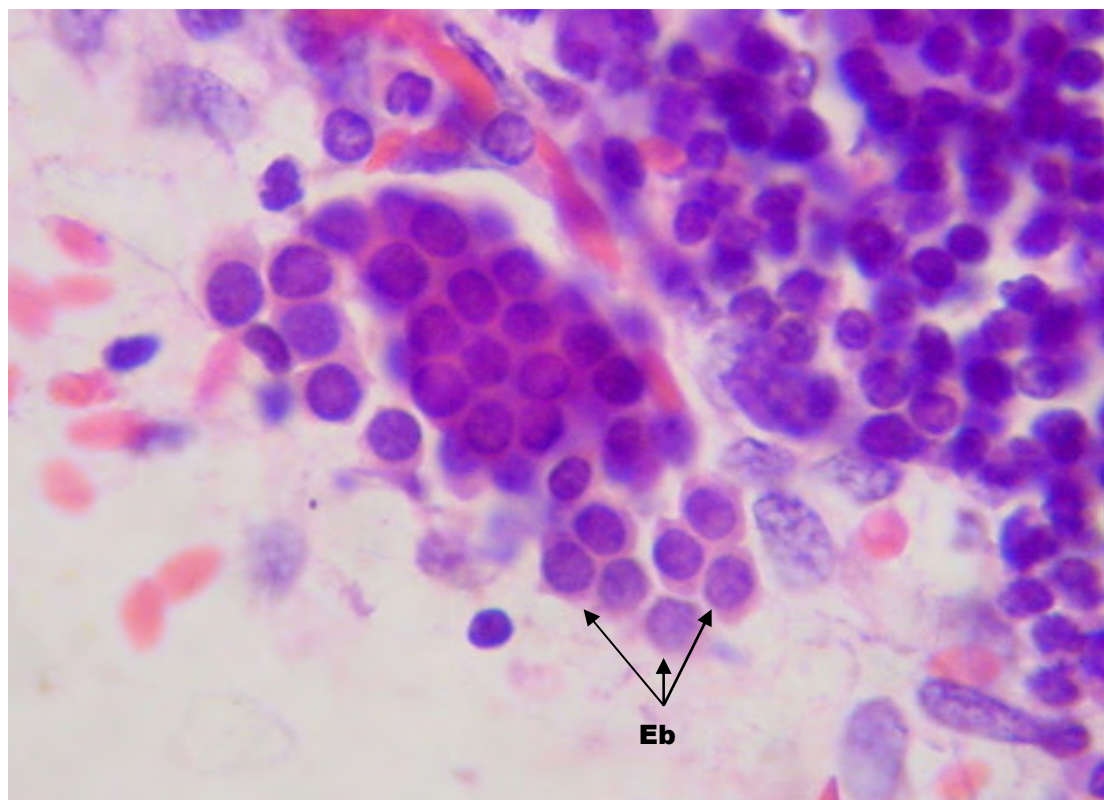


Figura 30. Feto de 190 días: Sección cervical anterior. Zona subcapsular mostrando agrupamiento de células eritroblásticas (Eb) que presentan núcleo basófilo prominente con nucleolos y acidofilia citoplasmática. H-E 1000X.

La sección cervical posterior, la distribución de corteza y médula es evidente, citoarquitecturalmente caracterizados de manera similar para el segmento homólogo a lo descrito en la edad fetal de 165 días. La cápsula está compuesta de 1 ó 2 líneas celulares de fibrocitos y fibroblastos. Subcapsularmente y en las trabéculas se observan múltiples vasos sanguíneos fenestrados pletorizados y contiguos a estos se ubican varios tipos celulares libres como los descrito en el segmento anterior. La zona cortical muestra a las células reticulares epiteliales limitantes y bajo éstas los timocitos dispuestos densamente en el parénquima, algunos vasos sanguíneos corticales pletorizados están rodeados por células reticulares epiteliales (*Fig. 31*); en algunas áreas corticales periféricas se observan grupos de células hematopoyéticas indiferenciadas. La zona medular es laxa y muestra la trama reticulocelular sobre los timocitos y los corpúsculos de Hassal se distribuyen de manera similar al segmento anterior. La transición corticomedular es evidente y en algunas zonas se observan las células reticulares epiteliales próximas entre sí rodeando a los timocitos.

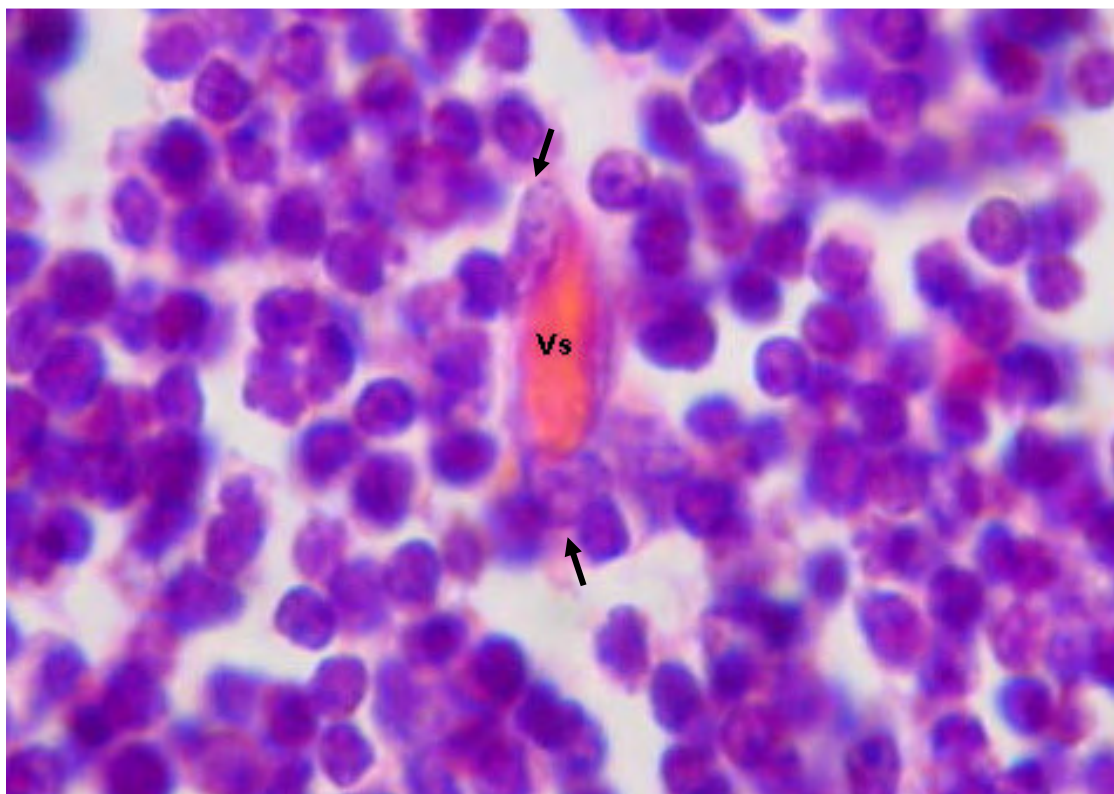


Figura 31. Feto de 190 días: Sección cervical posterior. Vaso sanguíneo pletorizado cortical (Vs), compuesto por 2 células endoteliales planas y rodeadas por células reticulares epiteliales limitantes perivasculares (flechas). Timocitos (T). H-E 1000X.

La sección torácica, muestra los lobulillos bien organizados y diferenciados, citoarquitecturalmente caracterizados de manera similar a su segmento homólogo descrito en la edad de 165 días. La cápsula es fina y está compuesta por tejido conjuntivo laxo al igual que las trabéculas (*Fig. 32*). Subcapsularmente y en los espacios trabeculares se encuentran abundantes vasos sanguíneos fenestrados pletorizados y contiguos a estos, múltiples células libres de la línea blanca y grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados en mayor número a las edades fetales anteriores. La corteza presenta las células reticulares epiteliales limitantes que la revisten y bajo éstas, se encuentran los timocitos densamente dispuestos, algunos vasos sanguíneos y ocasionalmente se ubican aislados y bien periféricamente grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados en el parénquima cortical. En la zona medular, la distribución citoarquitectural se dispone de manera similar a los segmentos tímicos cervicales descritos anteriormente.

A ésta edad fetal la medida diametral de los timocitos dispuestos en el tejido tímico, se muestran en (*Tabla 2*).

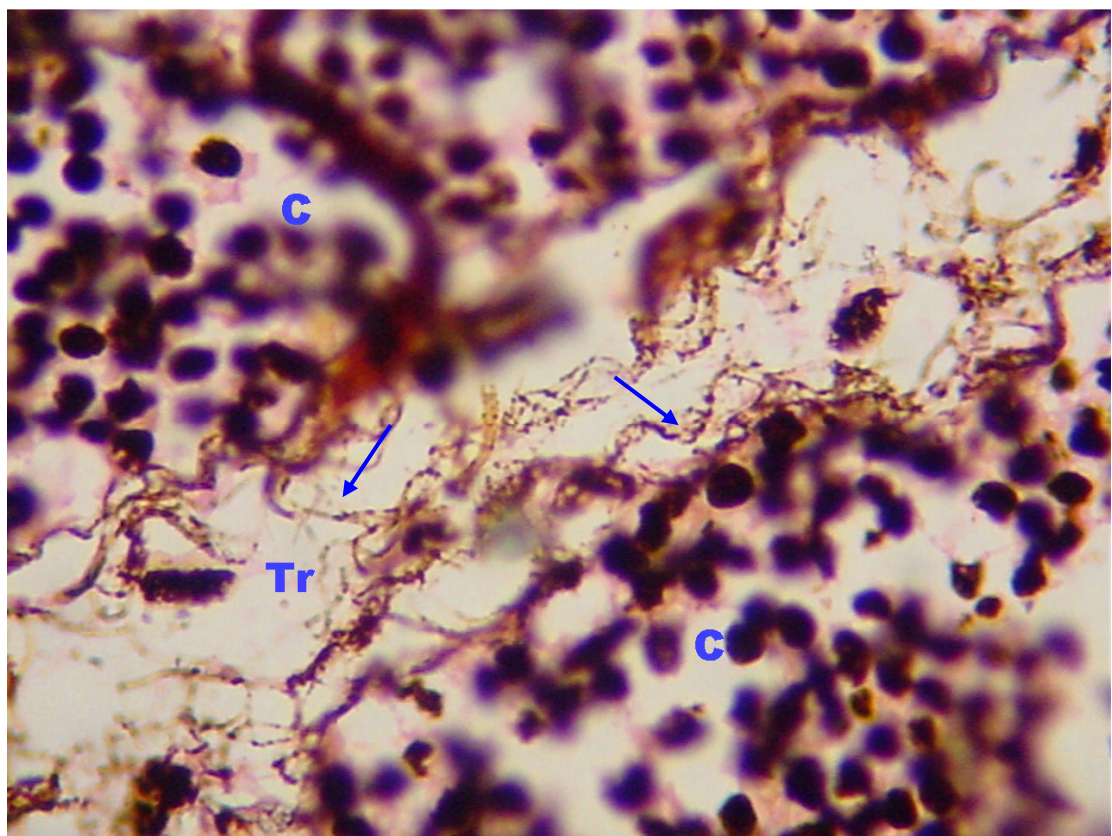


Figura 32. Feto de 190 días: Sección torácica. Fibras reticulares de color negro (flechas) dispuestas en zona trabécular (Tr). Corteza tímica (C). T de Wilder 1000X.

4.2. MEDIDA DIAMETRAL DE LOS TIMOCITOS.

La medida diametral promedio obtenida de los timocitos difiere en las 2 regiones tímicas, siendo los timocitos medulares más grandes que sus pares corticales y se presenta en (*Tabla 2*).

Tabla 2: Medida diametral del timocito en corteza y médula tímica en 4 etapas etareas.

<i>Edad Fetal (días)</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>
100	3,70 μm .	4,60 μm .
130	3,70 μm .	4,50 μm .
165	4,30 μm .	4,70 μm .
190	4,20 μm .	5,10 μm .

4.3. RESUMEN DEL DESARROLLO CITOARQUITECTURAL.

El desarrollo de la estructura tímica, así como su conformación celular se muestra de manera sintetizada en (*Tabla 3*).

Tabla 3: Resumen del desarrollo citoarquitectural tímico en fetos de alpaca.

EDAD / Sección tímica		Estructura "acinar"	Estructura "folicular"	Estructura "cavitaria"	Definición Trabecular (C/M)	Poblamiento de timocitos	Bicapa capsular	Barrera celular (C/M)	Barrera hemato tímica	Macrófagos	Corpúsculos de Hassal	Células eritroblásticas	Mastocitos
40 días	C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
60 días	C	-	+	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	+	-	+	-
100 días	C	-	+	-	-	+	+/-	-	+/-	+	-	+	-
	T	-	-	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-
130 días	C	-	-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+
	T	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
165 días	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	T	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
190 días	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	T	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) = presencia
 (-) = ausencia
 (+/-) = en evolución

C = cervical
 T = torácico
 C/M = corticomedular

V. DISCUSIÓN

El timo en fetos de alpaca es una estructura ubicada similarmente a la de otros rumiantes domésticos, abarcando desde la parte craneal cervical hasta la región torácica, como también lo observaron Machado *et al.* (2001), quienes determinaron la morfología del timo en fetos de búfalos, la cual comprendía un lóbulo torácico y un lóbulo cervical, teniendo éste último tres porciones, una porción mediana caudal unida a través del istmo a dos porciones laterales craneales que se originan desde los ángulos mandibulares.

En general, el desarrollo del embrión y del feto en los camélidos sudamericanos es similar a lo que se ha establecido para otras especies rumiantes domésticos, como lo menciona Bravo (2002), quien asevera dicha definición. Los diferentes autores no determinan un punto de quiebre específico donde deja de ser embrión para considerarse feto. Parraguez *et al.* (1997) a los 30 días de gestación todavía lo denominan embrión, a diferencia de Bustinza (2001), que lo determina a una etapa más madura considerando embriones hasta los 60 días. Bravo (2002) menciona que el crecimiento de la vesícula embrionaria y del embrión es rápido durante los primeros 45 días después del empadre y el sexo del feto es distinguible a los 2 meses de preñez. Huanca (1993) y Fernández-Baca (1971) consideran embrión hasta los 55 días, debido a que han alcanzado un grado de diferenciación que incluyen a los genitales externos. Pizarro (1999), asume que luego de la diferenciación del sistema orgánico alrededor de la quinta semana (35 días) de gestación ya se pueden distinguir claramente la cabeza, ojos, corazón, hígado y otros órganos, condiciones que considera para nominarlo como feto. Por lo tanto, en el presente estudio se considera feto a los 40 días, luego de determinar su edad fetal en función del diámetro biparietal, ya que el espécimen presentaba una diferenciación morfológica externa de la cabeza, similar al feto de 130 ó 165 días y además se encontraron desarrollados algunos órganos vitales de la cavidad abdominal como el hígado, bazo e intestinos de manera similar a lo determinado por Pizarro (1999) para ser considerado como feto.

En el presente estudio, el esbozo del timo ya es visible a los 40 días de edad, similar a lo que observaron Schultz *et al.* (1973), quienes visualizaron microscópicamente en el feto bovino el desarrollo del esbozo tímico por primera vez a los 42 días de gestación, a pesar que los camélidos sudamericanos tienen un período gestacional más largo (11 meses) en comparación a los bovinos (9 meses). En este período de tiempo en el feto de

alpaca se observó formaciones celulares dispuestos como acinos glandulares, cordones o rosetas; éste esbozo estructuralmente es similar como lo describen Jubb *et al.* (1993), para los animales domésticos, donde mencionan que el componente epitelial reticular en sus comienzos son desplazados caudalmente en el cuello e invade el intersticio mediastínico con yemas tipo roseta irregulares, sólidas que crecen para formar los lóbulos primordiales. Además, en el esbozo tímico fetal de alpaca se observaron células esféricas de característica nuclear interna pequeña y escaso citoplasma compatibles con células linfoides (timocitos) dispuestas dentro y entre los cordones o rosetas, de manera similar Osburn *et al.* (1982) mencionan que los linfocitos (timocitos) se aprecian tan temprano como a los 45 días de gestación en el timo fetal bovino, así como, Jubb *et al.* (1993) reportan que en el timo fetal ovino se observaron los linfocitos (timocitos) a los 43 días de gestación. Se presume que éstas células son las primeras células pro timocitos (linfoblastos) que están siendo reclutadas desde órganos hematopoyéticos fetales hacia el timo primitivo para poblarlo y comenzar el proceso de maduración tímico y dar origen a los primeros linfocitos T.

Siguiendo el desarrollo del timo fetal de las especies domésticas Jubb *et al.* (1993) no precisan la edad fetal específica, pero mencionan que el desarrollo temprano del sistema lobular primitivo las células reticulares epiteliales que forman las yemas tipo rosetas se estratifican tomando formas sólidas y luego se hacen císticas, como al parecer sucede en el timo fetal de alpaca ya que se aprecian cavidades en el esbozo a los 60 días, que probablemente estuvieron con menos densidad celular en etapas tempranas, que lo hallado en el presente estudio a la edad mencionada anteriormente, donde se encontró las cavidades divididas por trabéculas e invadido por múltiples tipos celulares sanguíneos libres y abundantes vasos sanguíneos tortuosos pletorizados, concordando esto último con Banks (1992), quien menciona que el desarrollo de la formación de lóbulos que contienen componentes medulares y corticales, ocurre luego de la invasión vascular.

La cápsula tímica en general desde el estadio temprano de 60 días se observa que es gruesa y compuesta por tejido conjuntivo laxo y de 3 a 4 capas de fibroblastos y a partir de los 100 días está conformada por 2 capas de fibroblastos, ocasionalmente se pueden observar hasta 3 capas celulares, en los fetos de 130 días se observan algunos fibrocitos en las capas celulares de la cápsula, esto concuerda con Sainte-Marie *et al.* (2005) quienes mencionan que la cápsula del timo de rata neonatal se compone de 2 capas, una externa que cubre la periferia del lóbulo tímico y una capa interna que delimita

completamente el contorno periférico de la corteza del lóbulo. Además, en el timo fetal de alpaca subcapsularmente se encuentran abundantes vasos sanguíneos pletorizados de endotelio plano fenestrados, ya que sus prolongaciones citoplasmáticas no evidencian continuidad entre las células endoteliales, y adyacentes a los vasos sanguíneos y en toda el área subcapsular se encuentran libres diversos tipos celulares como células de la línea blanca y roja, esto está relacionado con lo que reportan Sainte-Marie *et al.* (2005) que en el timo de rata neonatal los capilares subcapsulares son fenestrados y los leucocitos estuvieron a menudo cercanos a estos, a su vez también participan en acontecimientos tímicos peculiares, tales como el reclutamiento de células precursoras sanguíneas. Entre estos tipos celulares Schultz *et al.* (1973) describen que los eosinófilos fueron observados algunas veces en el timo fetal bovino, no precisando la edad fetal, ya que su estudio abarca embriones de menos de 40 días y fetos de 225 días, pero si precisan que los granulocitos aparecen en la circulación sanguínea aproximadamente a los 130 días de edad fetal, y en el presente estudio se observó a partir de los 100 días de edad diferentes tipos celulares en el área subcapsular compatibles con células de la línea mieloide y eritroide, linfocitos y eritrocitos, así como a partir de los 130 días células granulares mesenquimatosas como mastocitos.

Los timocitos tuvieron algunas diferencias en su morfología, sobre todo en tamaño que fueron evidentes en las regiones tímicas de los fetos de alpaca. Los timocitos en la corteza fueron más pequeños que los medulares, mostrando estos últimos un núcleo más grande y más citoplasma, similarmente a lo descrito por Romano *et al.* (1999a) en el desarrollo del timo de la brema de mar, así como Junqueira *et al.* (1988), quienes mencionan que en el timo humano los timocitos corticales son pequeños y en la médula los timocitos son más grandes. En el timo fetal de alpaca ya definido en corteza y médula, encontramos en la zona subcapsular entre los timocitos pequeños, algunos timocitos grandes, como lo afirman Henrikson *et al.* (1997) y definen que éstas células son pro timocitos (linfoblastos) que originan a los timocitos y siguen el curso de maduración dentro del parénquima tímico.

Abbas *et al.* (2002) y Roitt *et al.* (1997) mencionan que el 5% de los timocitos corticales en proceso de maduración alcanzan la médula del timo y llegan a abandonar el mismo, más no el 95% de los timocitos que mueren por un proceso de apoptosis. En el presente estudio, no se pudo determinar las figuras de apoptosis de los timocitos, esto se debe probablemente a lo reportado por Cotran *et al.* (2000) respecto a la constricción

celular y la formación de cuerpos apoptóticos, quienes definen que estos eventos ocurren de manera rápida, y los fragmentos se fagocitan igualmente rápido, se degradan o se eliminan y no inducen inflamación, lo que hace difícil su detección histológica por el microscopio óptico. Por otro lado, Romano *et al.* (1999b) aseguran que en la ontogenia del timo del pez carpa, las células apoptóticas no fueron detectadas en el primer rudimento tímico, pero un número conspicuo de timocitos apoptóticos fue detectado por microscopia electrónica de transferencia, concomitantemente con la primera aparición de las células reticulares epiteliales corticales y medulares, y numerosos macrófagos estuvieron concentrados en el borde corticomedular y frecuentemente llenos de cuerpos apoptóticos, que probablemente representen la eliminación de los timocitos autoreactivos. En el presente estudio, la presencia de macrófagos fue evidente desde los 60 días, los cuales cumplirían la función de remoción de los cuerpos apoptóticos, pero no se pudieron determinar dichos cuerpos.

En el timo fetal de alpaca se puede apreciar la unión corticomedular como una barrera celular de células reticulares epiteliales dispuestas secuencialmente próximas entre sí, donde deben ocurrir ciertos eventos como lo mencionan Abbas *et al.* (2002), quienes dicen que durante la migración de los timocitos a través de la unión corticomedular ocurren interacciones físicas con las células reticulares epiteliales.

En cuanto a los corpúsculos de Hassal, a la edad fetal de 100 días la porción torácica ya se organiza en lobulillos con corteza definida que comparten una médula común, donde la presencia del corpúsculo medular de Hassal, estructura histológica característica de la médula tímica ya está presente en el timo fetal de alpaca, a diferencia de lo que menciona Schultz *et al.* (1973) quienes encontraron que los corpúsculos de Hassal se observaron regularmente después de su primera aparición a los 65 días en el timo fetal bovino; en algunas zonas medulares se observaron los corpúsculos de Hassal, mostrando las células reticulares epiteliales en varias etapas de degeneración, donde algunos corpúsculos se muestran como agrupaciones de células reticulares epiteliales en número de 3 a 5 con grandes núcleos basófilos claros y cromatina dispersa y citoplasma acidófilo tenue con presencia de “gránulos” basófilos en su citoplasma (“imagen de queratina”). Esto se debe a su origen embriológico de las células reticulares epiteliales del corpúsculo mencionado, según Jubb *et al.* (1993) existen 2 corrientes de migración epiteliales de la tercera bolsa faríngea, de la parte más alta del epitelio faríngeo, se derivan los corpúsculos de Hassal y el epitelio tímico (células reticulares epiteliales

limitantes) y de la parte más baja del epitelio faríngeo, se derivan las células reticulares epiteliales medular y cortical, esto le confiere la característica epitelial a las células reticulares epiteliales tímicas, lo que es corroborado por Henrikson *et al.* (1997), Dellmann *et al.* (1980), Banks (1992) y Junqueira *et al.* (1988) quienes encuentran que éstas células poseen filamentos intermedios de queratina y se interconectan por desmosomas, de manera similar, Romano *et al.* (1999a) observaron en la médula del timo en desarrollo de la brema de mar, los corpúsculos de Hassal y sólo en los juveniles, caracterizadas por ser células reticulares epiteliales aplanadas, ricas en filamentos intermedios, observándose además restos celulares en el centro de los corpúsculos. En el presente estudio, se pudo observar a partir de los 100 días, como se mencionó anteriormente, los corpúsculos de Hassal similar a lo descrito por Banks (1992) y Dellmann *et al.* (1980) encontrándose estructuras compuestas por cuerpos acidófilos que constituyen células reticulares epiteliales aplanadas y frecuentemente hialinizadas, dispuestas alrededor de una zona central constituída por una o varias células queratinizadas (pigmentos basófilos) y/o degenerados.

En las observaciones sobre la barrera timo-sangre de los fetos de alpaca, se observaron los componentes celulares que acompañan a los vasos sanguíneos que penetran el esbozo tímico. En el desarrollo temprano de 40 días, los vasos sanguíneos se observan que discurren libres entre las rosetas de células reticulares epiteliales primitivas, pero en el feto de 60 días es donde ya se puede apreciar a células reticulares epiteliales limitantes perivasculares rodeando los vasos sanguíneos, y se hace más evidente en fetos de mayor edad, observándose de manera similar como lo describe Fernández (1999) en el estudio histológico del timo de la alpaca adulta, quien observó que los vasos sanguíneos del parénquima tímico, se observan en mayor número en la médula, y presentan un endotelio plano y algunos son rodeados por células reticulares epiteliales limitantes perivasculares, los cuales constituirían un elemento de la barrera hematotímica. Henrikson *et al.* (1997) definen que ésta barrera protege a los timocitos inmuno incompetentes de los antígenos, y la barrera timo-sangre cortical está constituida por endotelio capilar, macrófagos perivasculares, células reticulares epiteliales limitantes perivasculares, sin embargo, ésta barrera es menos efectiva en la médula, y es corroborado por Carrascal (2005), quien establece que la barrera medular, está compuesta por un grueso endotelio fenestrado, lámina basal gruesa y las células reticulares epiteliales limitantes perivasculares.

En el timo fetal de alpaca se aprecian grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados formando nidos, compatibles con células eritroblásticas, éstas células son de núcleo esférico basófilo intenso con presencia de nucleolos y citoplasma acidófilo, la proporción de núcleo a citoplasma es de 6:1 aproximadamente. Éstas células se ubican en las cavidades del timo inmaduro de 60 días, pero a partir de que el timo se organiza y sus cavidades se pueblan de timocitos y se definen la corteza y médula, éstas células eritroblásticas se ubican principalmente en las áreas trabeculares y subcapsularmente, ocasionalmente se encuentran en la corteza periférica. Vicente *et al.* (1998) reportan que el parénquima cortical del timo de rata hospeda una eritropoyesis transitoria alrededor del nacimiento. Esto nos indicaría que el timo fetal de alpaca también estaría cumpliendo una mínima función eritropoyética aislada.

Finalmente, Dellmann *et al.* (1980) mencionan que en las mallas reticulares epiteliales del timo se pueden encontrar células plasmáticas, similar a los hallazgos de Schultz *et al.* (1973) quienes describen algunas células plasmáticas en los fetos bovinos. En el presente estudio, se observó células compatibles con plasmocitos diseminados en las áreas subcapsulares y trabeculares de los lobulillos en los fetos más desarrollados como el de 190 días, aunque es probable que los fetos de 130 días también puedan albergar éste tipo celular.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El timo fetal de alpaca se ubica anatómicamente de manera similar al de otros fetos de rumiantes domésticos.
- 2.- El desarrollo citoarquitectural del timo fetal de alpaca sigue un patrón similar al de otras especies de rumiantes domésticos.
- 3.- La cápsula tímica se organiza a los 100 días, conformada por tejido conjuntivo laxo y 2 capas celulares, haciéndose más fina en la región torácica conforme avanza el desarrollo fetal.
- 4.- El rudimento tímico está presente a la edad de 40 días, definiéndose en corteza y médula a la edad de 100 días en los segmentos cervicales posteriores y torácicos, completándose la diferenciación para todos los segmentos tímicos a los 130 días de edad.
- 5.- Los timocitos corticales son más pequeños que sus pares medulares.
- 6.- Los corpúsculos de Hassal se encontraron en la médula tímica a partir de los 100 días de edad.
- 7.- El timo fetal de alpaca alberga algunos nidos celulares eritroblásticos.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Complementar el presente estudio con pruebas inmunohistoquímicas para determinar las diferentes subpoblaciones celulares tímicas y establecer su ubicación estratégica en el parénquima tímico fetal.
- 2.- Realizar estudios anatómicos más detallados del timo fetal.

VIII. LITERATURA CITADA

- 1.- Abbas, A.K.; A.H. Lichtman y J.S. Pober. 2002. Inmunología celular y molecular. 4^{ta} Ed., p. 129-165. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- 2.- Banks, J. 1992. Histología veterinaria aplicada. p. 399-415. Editorial Manual Moderno, Mexico DF.
- 3.- Bockman, D.E. 1998. Development of the thymus. Microsc. Res. Tech. 38 (3): 209-215.
- 4.- Bockman, D.E. and W.B. Winborn. 2005. Ultrastructure of thymic myoid cells. J. Morphol. 129 (2): 201-210.
- 5.- Bravo, W. 2002. The reproductive process of south american camelids. p. 10-21. Seagull Printing, Salt Lake City.
- 6.- Bustinza, J.A. 2000. Enfermedades de alpacas. 2^{da} Ed., p. 1-40. EMAVI'S-UNA, Arequipa.
- 7.- Bustinza, A.V. 2001. La Alpaca, conocimiento del gran potencial andino. 1^{ra} Ed., p. 206-211. Oficina de recursos del aprendizaje-Sección publicaciones-UNA, Puno.
- 8.- Carlson, B.M. 1990. Embriología básica de Patten. 5^{ta} Ed., p. 548-563. Interamericana McGraw-Hill, México DF.
- 9.- Carrascal, E. 2005. Histología Humana. Facultad de Medicina-Universidad de Salamanca, Salamanca.
- 10.- Cordier, A.C. and S.M. Haumont. 2005. Development of thymus, parathyroids and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. Am. J. Anat. 157 (3): 227-263.
- 11.- Cotran, R.S.; V. Kumar y T. Collins. 2000. Patología estructural y funcional de Robbins. 6^{ta} Ed., p. 19-27. Interamericana McGraw-Hill, México DF.
- 12.- Cunningham, C.P.; W.G. Kimpton; J.E. Holder and R.N.P. Cahill. 2001. Thymic export in aged sheep: a continuous role for the thymus throughout pre and postnatal life. Eur. J. Immunol. 31 (3): 802-811.
- 13.- Dellmann, H.D. y E.M. Brown. 1980. Histología veterinaria. p. 177-198. Editorial Acribia, Zaragoza.
- 14.- Espinoza-Chueca, A. 1995. Estudio microscópico de los ganglios linfáticos de la alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 44p.

- 15.- Fernández-Baca, S. 1971. La alpaca reproducción y crianza. Bol. Divulg.: UNMSM:IVITA-Zona Agraria XII (Puno) Minist. Agric., Lima 7:21-23.
- 16.- Fernández, D. 1999. Caracterización de la estructura histológica de los órganos linfoides en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 51p.
- 17.- Fowler, M.E. 1998. Medicinal and surgery of south american camelids (llama, alpaca, vicuña, guanaco). 2nd Ed., p. 364-373, 396-404, 491-492. Univ. Press Anes, Iowa.
- 18.- Gazitua, F.J.; P. Corradini; G. Ferrando; L.A. Raggi and V.H. Parraguez. 2001. Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*). Anim. Reprod. Sci. 66 (1-2): 81-92.
- 19.- Gilbert, S.F. 2000. Developmental biology. 6th Ed., p. 485-490. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- 20.- Henrikson, R.C.; G.I. Kaye and J.E. Mazurkiewicz. 1997. Histology the national medical series for independent study. p. 215-220. William & Wilkins, USA.
- 21.- Hildebrand, M. 1991. Anatomía y embriología de los vertebrados. 1^{ra} Ed., p. 298-300, 371. Editorial Limusa, Balderas-Mexico DF.
- 22.- Huanca, T. 1993. Manual del alpaquero. 3^{ra} Ed., p. 44-45. Proyecto Alpacas INIA-COTESU/IC. Serie Manual N° 8, Lima.
- 23.- Humason, G.L. 1967. Animal tissue techniques. 2nd Ed., p. 13-14. W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- 24.- Iañez, E. 1999. Maduración, activación y diferenciación de los linfocitos T. En: Curso de inmunología general. Departamento de Microbiología-Universidad de Granada, España.
- 25.- Jubb, K.V.F.; P.C. Kennedy and N. Palmer. 1993. Pathology of domestic animals. 4th Ed., vol. 3, p. 209-211. Academic Press, Inc., California.
- 26.- Junqueira, L.C. y J. Carneiro. 1988. Histología básica. 3^{ra} Ed., p. 285-306. Editorial Salvat S.A., Barcelona.
- 27.- Le Dourain, N.M.; F. Dieterlen-Lièvre and P.D. Oliver. 2005. Central sites of lymphocyte development and dissemination, ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. Am. J. Anat. 170 (3): 261-299.
- 28.- Luna, L.G. 1968. Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Ed., p. 92-95, 162-163. Mc Graw-Hill Book Company, New York.

- 29.- Machado, G.V.; P. Romagnolli; P.R. Gonçalves and A. Parizzi. 2001. The morphology of the thymus in buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*): shape location and arterial supply. Arch. Vet. Sci. 6 (1): 25-30.
- 30.- Mc Manus, J.F.A. and R.W. Mowry. 1960. Staining methods histologic and histochemical. p. 377-379. Paul B. Hoeber, Inc., New York.
- 31.- Moll, U.M. 1998. Functional histology of the neuroendocrine thymus. Microsc. Res. Tech. 38 (3): 300-310.
- 32.- Montalvo, C. 1987. Desarrollo prenatal de la alpaca. p. 79-82. Proyecto de desarrollo de la crianza de alpaca. Convenio IVITA-COTESU, Lima
- 33.- Noden, D.M. y A. de Lahunta. 1990. Embriología de los animales domésticos. p. 231-232, 295-304. Editorial Acribia, Zaragoza.
- 34.- Osburn, B.I.; N.J. MacLachlan and T.G. Terrel. 1982. Ontogeny of the immune system. J.A.V.M.A. 181 (10): 1049-1051.
- 35.- Parraguez, V.H.; S. Cortez; F.J. Gazitua; G. Ferrando; V. MacNiven and L.A. Raggi. 1997. Early pregnancy diagnosis in alpaca (*Lama pacos*) and llama (*Lama glama*) by ultrasound. Anim. Reprod. Sci. 47 (1-2): 113-121.
- 36.- Pizarro, R. 1999. Camelidotecnia. 1^{ra} Ed, p. 70-73, 108-109. Auspiciado por el Concytec, Lima.
- 37.- Popesko, P. 1990. Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos. Tomo I, p. 47, 73, 75, 107 y Tomo II, p. 26, 105. Editorial Salvat S.A., Barcelona.
- 38.- Roitt, I.; J. Brostoff y D. Male. 1997. Inmunología. 4^{ta} Ed., p. 10.1-10.15. Harcourt Brace, Madrid.
- 39.- Romano, N.; M. Fanelli; G. Maria del Papa; G. Scapigliati and L. Mastrolia. 1999a. Histological and cytological studies on the developing thymus of sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. J. Anat. 194 (1): 39-50.
- 40.- Romano, N.; A.J. Taverne-Thiele; M. Fanelli; M.R. Baldassini; L. Abelli; L. Mastrolia; W.B. Van Muiswinkel, and J.H.M.W. Rombout. 1999b. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. Dev. Comp. Immunol. 23 (2): 123-137.
- 41.- Sainte-Marie, G.; F.S. Peng and D. Marcoux. 2005. The stroma of the thymus of the rat: morphology and antigen diffusion, a reconsideration. Am. J. Anat. 177 (3): 333-352.

- 42.- Schultz, R.D.; H.W. Dunne and C.E. Heist. 1973. Ontogeny of the bovine immune response. *Infect. Immun.* 7 (6): 981-991.
- 43.- Shortman, K. 2005. What the papers say: early steps in T lymphocyte development within the thymus. *Bioessays.* 2 (5): 215-216.
- 44.- Sisson, J. y D. Grossman. 2000. *Anatomía de los animales domésticos.* 5^{ta} Ed., Tomo I, p. 1178. Editorial Masson S.A., Madrid.
- 45.- Smith, C. 2005a. Studies on the thymus of the mammal. XVI. Lipopigment cells in the cortex of the thymus of the mouse. *Am. J. Anat.* 124 (3): 389-409.
- 46.- Smith, C. 2005b. Studies on the thymus of the mammal. XIV. Histology and histochemistry of embryonic and early postnatal thymuses of C57B1/6 and AKR strain mice. *Am. J. Anat.* 116 (3): 611-629.
- 47.- Tizard, I.R. 2002. *Inmunología veterinaria.* 6^{ta} Ed., p. 74-89, 227-239, 470-484. Mc Graw-Hill Interamericana, México DF.
- 48.- Van Ewijk, W. 2005. Central sites of lymphocyte development and dissemination, immunohistology of lymphoid and non-lymphoid cells in the thymus in relation to T lymphocyte differentiation. *Am. J. Anat.* 170 (3): 311-330.
- 49.- Varas, A.; R. Sacedón; C. Hernández-López; E. Jiménez; J. García-Ceca; J. Arias-Díaz; A. Zapata and A. Vicente. 2003. Age-dependent changes in thymic macrophages and dendritic cells. *Microsc. Res. Tech.* 62 (6): 501-507.
- 50.- Vicente, A.; A. Varas; R. Sacedón and A.G. Zapata. 1998. Histogenesis of the epithelial component of rat thymus: an ultrastructural and immunohistological analysis. *Anat. Rec.* 244 (4): 506-519.

IX. ANEXOS

9.1. Fijador de formalina bufferada neutral:

Formol (40% formaldehydo en H ₂ O).....	100 ml.
Fosfato de Sodio, dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	7.83 g.
Fosfato de Sodio, monobásico (NaH ₂ PO ₄).....	4.21 g.
Cloruro de Sodio (ClNa).....	8.50 g.
Agua desionizada c.s.p.....	1000 ml.

Diluir en 900 ml de cloruro de sodio las sales de sodio y homogenizar, luego se agrega 100 ml de formol al 40% y así obtenemos la solución bufferada al 10%.

9.2. Fijador de Bouin:

Fijar por 24 horas o más (varias semanas) pueden causar daño:

Ácido pícrico, agua saturada.....	75 ml.
Formalina, concentrado.....	25 ml.
Ácido acético glacial.....	5 ml.

9.3. Tinción de Hematoxilina eosina:

Procedimiento:

1. Desparafinar: 1) xilol: 2 cambios, 2) Alcohol de 100°: 2 cambios, 3) Alcohol de 95°: 1 cambio, 4) Alcohol de 70°: 1 cambio. 2-3 minutos en cada cambio.
2. Lavar en agua corriente, sumergiendo en un frasco de Borrel, durante 5 minutos.
3. Enjuagar bien en agua destilada, durante 5 minutos.
4. Colorear en Hematoxilina de Mayer.
5. Lavar en agua corriente. Dejar secar.
6. Enjuagar en agua destilada, durante 2 a 5 minutos.
7. Colorear en Eosina por 5 minutos.
8. Inmersión en alcohol de 95°, 3 cambios, 1-2 minutos cada uno.
9. Inmersión en alcohol de 100, 2 cambios hasta que las secciones estén claras.
10. Inmersión en xilol, varios cambios hasta que las secciones estén claras. Montar.

Resultados: núcleos: azul; citoplasma: rosado.

9.4. Tinción de Masson:

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
2. Fijar en la solución de Bouin por una hora a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente, si la formalina se fijó.
3. Dejar enfriar y lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar en agua destilada.
5. Solución hematoxilina hierro de Weigert por 10 minutos. Lavar en agua corriente por 10 minutos.
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Solución fucsina ácida-escarlata Biebrich por 2 minutos. Guardar la solución.
8. Enjuagar en agua destilada.
9. Solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico por 10 a 15 minutos antes de la solución de azul de anilina (Ácido fosfotungstico acuoso al 5% por 15 minutos antes de la coloración de las partes no teñidas con verde claro). Descartar la solución.
10. Solución de azul de anilina por 5 minutos o solución verde claro por un minuto (para el sistema nervioso central 15 a 20 minutos) Guardar la solución.
11. Enjuagar en agua destilada.
12. Solución acética glacial por 3 a 5 minutos. Descartar la solución.
13. Deshidratar en alcohol al 95%, alcohol puro, y clarificar en xileno, 2 veces cada uno.
14. Fijar con Permound o Histoclad.

Resultados: núcleos: negro; citoplasma, queratina, fibras musculares y fibras intercelulares: rojo; colágeno: azul.

9.5. Tinción de Wilder:

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
2. Oxidar en una solución de ácido Fosfomolibdico por un minuto.
3. Enjuagar bien en agua corriente o las células se mantendrán amarillas.
4. Sintetizar en una solución de nitrato de uranio por un minuto.
5. Enjuagar en agua destilada de 10 a 20 segundos.
6. Colocar en solución de plata amoniacal por 1 minuto (cambiar la solución frecuentemente).

7. Sumergir muy rápidamente en alcohol al 95% y ponerlo inmediatamente en:
8. En una solución reductora por 1 minuto (cambiar la solución frecuentemente).
9. Enjuagar bien en agua destilada.
10. Entonar en la solución de cloruro de oro por 1 minuto o hasta que las partes de la muestra pierdan su color amarillo y se tornen lila o morado claro. Demasiada entonación del color hará las muestras rojas. Chequear individualmente bajo el microscopio.
11. Enjuagar en agua destilada.
12. Solución de tiosulfato de sodio por 1 minuto.
13. Lavar bien en agua de caño.
14. Colorear las partes no teñidas, si es deseado, con la solución rápida roja nuclear. Enjuagar bien en agua destilada.
15. Deshidratar en alcohol al 95%, alcohol puro y clarificar en xileno, 2 veces cada uno.
16. Montar o preparar con Histoclad o Permount.
Resultados: fibras reticulares: negras; colágeno: rosa; otros elementos tisulares: rojos.

9.6. Tinción de Johnson:

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
2. Solución de azul de toluidina por 2 minutos.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Cubrir la muestra con agua destilada.
5. Secar alrededor del borde del cubre objeto y sellar con brillo de uñas.
6. Examinar las muestras tan pronto sea posible después de la preparación.

Resultados: tejido metacromático: rosado.